



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

EFEITO DE ANTIMICROBIANOS SOBRE BIOFILMES DE
STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA EM DIFERENTES
ESTÁGIOS DE FORMAÇÃO

BÁRBARA ELLEN SANTOS CARVALHAIS

VITÓRIA, ES

NOVEMBRO, 2018



EFEITO DE ANTIMICROBIANOS SOBRE BIOFILMES DE
STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA EM DIFERENTES
ESTÁGIOS DE FORMAÇÃO

Bárbara Ellen Santos Carvalhais

Orientadora: Prof^a. Dr^a Kênia Valéria dos Santos

Dissertação apresentada à banca
examinadora do programa de pós-
graduação em ciências farmacêuticas
da Universidade Federal Do Espírito
Santo.

Orientadora: Kênia Valéria dos Santos

Universidade Federal do Espírito Santo

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Novembro, 2018

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

C331e Carvalhais, Bárbara Ellen Santos, 1991-
 Efeito de antimicrobianos sobre biofilmes de
 Stenotrophomonas maltophilia em diferentes estágios de
 formação / Bárbara Ellen Santos Carvalhais. - 2018.
 60 f. : il.

 Orientadora: Kênia Valéria dos Santos.
 Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
 Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
 Saúde.

 1. Agentes antiinfeciosos. I. dos Santos, Kênia Valéria. II.
 Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
 Saúde. III. Título.

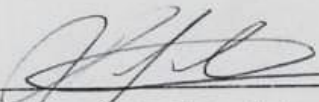
CDU: 615.1

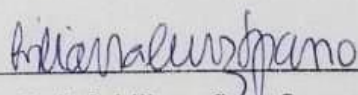
Bárbara Ellen Santos Carvalhais

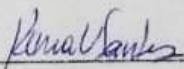
**EFEITO DE ANTIMICROBIANOS SOBRE BIOFILMES DE
STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA EM DIFERENTES
ESTÁGIOS DE FORMAÇÃO**

Trabalho de Dissertação de Mestrado aprovado em 06/12/2018 para obtenção
do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Ciências
Farmacêuticas, da Universidade Federal do Espírito Santo

BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. Ricardo Pinto Schenck / UFES


Prof.^a. Dr.^a. Liliana Cruz Spano / UFES


Prof.^a. Dr.^a. Kênia Valéria dos Santos (orientadora) / UFES

Vitória/ES

2018

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, Ele, o autor de minha vida, a minha fonte de força e coragem. Me concedeu o sonho de realizar um mestrado e vejo o Seu direcionamento por toda a minha vida, guiando os meus passos para que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais Aider e Geralda, meu irmão Igor e meus sogros Sandra e Márcio que muitas vezes foram e são o meu suporte.

Às meninas da casa 203, Gabi, Nati e Keila que me receberam, acolheram, ajudaram, torceram e estiveram comigo a maior parte do tempo desse curso.

Ao grupo mais (des)unido, “*powers*” desde o início da graduação, mesmo distantes fisicamente, sempre se fizeram presente, sempre acompanharam cada passo com palavras de incentivo.

Às minhas grandes amizades deixadas em Ipatinga (Lívia, Rhayane e Cássia), mas que me acompanham por telefone, me ouvindo, me ajudando a tomar decisões e por torcerem por mim, além de compreender minha ausência em momentos importantes.

Ao meu apoio maior, que desde o início, como namorado e agora como marido tem sido um guerreiro ao meu lado. O presente que a graduação me deu tem me incentivado a alcançar os meus sonhos e como eu já disse, nunca estive nem à frente nem atrás, mas sempre junto, lado a lado. Dedico esse trabalho a você que tanto me compreendeu e ajudou pra que essa vitória fosse alcançada.

À professora Kênia, que sem me conhecer me recebeu em seu laboratório e me ajudou, me dando suporte além do cargo de orientadora. Muitas vezes me mostrou que não há dúvidas bobas, mas há a vontade de descobrir e conhecer. Para trilhar este caminho toda conversa foi válida, toda correção, todo tempo disponibilizado. Sou grata também, por não ter se limitado a orientação deste trabalho, mas por dividir comigo experiências acadêmicas e pessoais, as quais vou levar comigo.

À Cris, meu braço direito no laboratório, que vivenciou comigo muitas experiências, compartilhando de bons e maus momentos, devo parte dessa

vitória a você, que me recebeu e me auxiliou quando cheguei me sentindo 'perdida' em uma nova universidade.

Às meninas do BioMA, Mariana, Jéssica, Maria e Bianca, do Resbac, Maralisi, do LabCAS, Monalessa, do Labvig, Luciana e aos técnicos Simone, Steveen, Luciana e Geraldo por toda ajuda e momentos compartilhados.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo apoio institucional e aos professores por suas disciplinas ministradas.

À Universidade Federal do Espírito Santo, onde tenho orgulho de ter me graduado com excelentes professores e amigos e onde realizei essa pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro.

E sabemos que todas as coisas contribuem juntamente para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito.

Romanos 8:28

RESUMO

Stenotrophomas maltophilia é um bacilo Gram-negativo não fermentador de carboidratos, que, embora seja de origem ambiental, tem sido relatado em bacteremias relacionadas ao uso de cateter, infecções das vias urinárias, endocardites, e infecções do trato respiratório, especialmente em pacientes imunossuprimidos. Além da resistência intrínseca a diversos antimicrobianos, outra característica de *S. maltophilia* que a torna um importante patógeno oportunista é sua capacidade de formação de biofilmes. Assim, nosso objetivo foi avaliar o efeito dos antimicrobianos indicados para o tratamento de infecções por *S. maltophilia* sobre o biofilme em diferentes fases de formação (adesão, crescimento exponencial e maturação). Foram avaliadas 19 amostras clínicas e uma amostra de referência (ATCC 13637) de *S. maltophilia* identificadas por métodos bioquímicos e confirmadas por amplificação da região 23S do RNA ribossômico. As amostras foram avaliadas quanto à similaridade por ERIC-PCR. Após esta caracterização inicial, as amostras foram submetidas aos seguintes testes: (i) capacidade de formação de biofilme; (ii) cinética de formação do biofilme; (iii) perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos cloranfenicol (CHL), levofloxacina (LVX), ceftazidima (CAZ), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT) e gentamicina (GEN) pelo método de microdiluição em caldo e (iv) determinação da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos contra biofilme (MIC-b) em diferentes estágios de formação. As amostras mostraram heterogeneidade genética na técnica utilizada. Todas foram produtoras moderadas de biofilme, mostrando aderência até a 4ª hora de incubação, crescimento exponencial entre a 4ª e 8ª hora e biofilme maduro entre 8 e 24 horas de incubação. Todas as amostras clínicas em suas formas plactônicas foram sensíveis à LVX e ao SXT e a maioria foi sensível ao CHL. Maiores frequências de resistência foram para CAZ e GEN. Observamos que a susceptibilidade bacteriana diminui à medida que o biofilme se torna maduro. O antimicrobiano com melhor atividade em biofilme, independentemente do tempo de formação foi GEN seguido de LVX. SXT que é o antimicrobiano de 1ª escolha para o tratamento de infecções por *S. maltophilia* foi o menos efetivo contra biofilmes, juntamente com CAZ. A determinação do perfil de suscetibilidade das amostras no biofilme mostra que

GEN foi o antimicrobiano com melhor atividade em todos os tempos de formação. CAZ foi o menos eficaz contra o biofilme de 24 horas e SXT foi o menos eficaz em biofilme de 4 e 6 horas. Considerando a razão MIC-b/MIC podemos organizar os antimicrobianos na seguinte ordem decrescente de atividade contra biofilmes de maduros (24h): GEN, LVX, CHL, SXT e CAZ. Com base nestes achados, concluímos que GEN pode ser uma boa opção contra infecções relacionadas a biofilmes de *S. maltophilia* em regiões onde este microrganismo apresente susceptibilidade aos aminoglicosídeos. LVX continua sendo uma boa opção contra biofilmes de *S. maltophilia*. Por outro lado, SXT que atualmente é considerado o padrão ouro para infecção por *S. maltophilia* não deve ser usado em infecções onde biofilmes possam estar presentes.

PALAVRAS-CHAVE: *Stenotrophomonas maltophilia*, biofilme, antimicrobianos, MIC-b.

ABSTRACT

Stenotrophomonas maltophilia is a non-fermenting carbohydrate Gram-negative bacillus, which although of environmental origin, has been reported in bacteremias related to catheter use, urinary tract infections, endocarditis, and respiratory tract infections, especially in immunosuppressed patients. In addition to the intrinsic resistance to several antimicrobials, another characteristic of *S. maltophilia* that makes it an important opportunistic pathogen is its ability to form biofilms. Thus, our objective was to evaluate the effect of antimicrobials indicated for the treatment of *S. maltophilia* infections on biofilm in different stages of formation (adhesion, exponential growth and maturation). We evaluated 19 clinical samples and one reference sample (ATCC 13637) of *S. maltophilia* identified by biochemical methods and confirmed by amplification of the 23S region of ribosomal RNA. Samples were evaluated for similarity by ERIC-PCR. After this initial characterization, the samples were submitted to the following tests: (i) biofilm formation capacity; (ii) biofilm formation kinetics; (iii) antimicrobial susceptibility profile to chloramphenicol (CHL), levofloxacin (LVX), ceftazidime (CAZ), sulfamethoxazole-trimethoprim (SXT) and gentamicin (GEN) by the broth microdilution method and (iv) determination of the minimum inhibitory concentration of antimicrobial agents against biofilm (MIC-b) at different stages of formation. The samples showed genetic heterogeneity in the technique used. All were moderate producers of biofilm, showing adhesion until the 4th hour of incubation, exponential growth between the 4th and 8th hour and mature biofilm between 8 and 24 hours of incubation. All clinical samples in their planktonic forms were sensitive to LVX and SXT and most were sensitive to CHL. Higher resistance frequencies were for CAZ and GEN. We observed that bacterial susceptibility decreases as the biofilm becomes mature. The antimicrobial with the best biofilm activity regardless of the formation time was GEN followed by LVX. SXT which is the first choice antimicrobial for the treatment of *S. maltophilia* infections was the least effective against biofilms along with CAZ. The determination of the susceptibility profile of the samples in the biofilm shows that GEN was the best antimicrobial activity at all formation times. CAZ was the least effective against 24 hour biofilm and SXT was the least effective in 4 and 6 hour biofilm. Considering the MIC-b/MIC ratio, we can organize antimicrobials in the following decreasing order of activity against mature (24h) biofilms: GEN, LVX, CHL, SXT and CAZ. Based on these findings, we conclude that GEN may be a good option against infections related to *S. maltophilia* biofilms in regions where this microorganism is susceptible to aminoglycosides. LVX remains a good option against *S. maltophilia* biofilms. On the other hand, SXT that is currently considered the gold standard for infection by *S. maltophilia* should not be used in infections where biofilms may be present.

KEY WORDS: *Stenotrophomonas maltophilia*, biofilm, antimicrobials, MIC-b.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de preparação das microplacas para o teste de microdiluição para determinação do MIC de cada antimicrobiano.	25
Figura 2: Identificação fenotípica de <i>S. maltophilia</i>	31
Figura 3: Gel representativo da PCR com os iniciadores SMI e SM4 da região 23S rRNA de <i>S. maltophilia</i>	32
Figura 4: Dendograma gerado baseado em fingerprint ERIC PCR de 19 isolados clínicos de <i>S. maltophilia</i> mais ATCC® 13637.	35
Figura 5: Distribuição das amostras clínicas de <i>S. maltophilia</i> (N= 19) mais a ATCC® 13637, quanto à intensidade de produção de biofilme.	36
Figura 6: Determinação do MIC-b de sulfametoxazol-trimetoprim (SXT) para <i>S. maltophilia</i> ATCC® 13637 em diferentes tempos de formação do biofilme.	40
Figura 7: Esquema de organização dos antimicrobianos em ordem decrescente (seta) de atividade contra <i>S. maltophilia</i> em diferentes estágios de formação de biofilme.	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Pontos de corte para os critérios interpretativos da susceptibilidade de *S. maltophilia*, o MIC dos controles utilizados neste estudo e a faixa de diluição dos antimicrobianos. 24

Quadro 2: Diluições seriadas utilizadas para o teste do MIC-b..... 29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de células planctônicas de 19 amostras clínicas de *S. maltophilia* 34

Tabela 2: Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das amostras de *S. maltophilia* na forma planctônica (MIC) e em biofilme (MIC-bv)..... 39

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de 19 amostras clínicas de *S. maltophilia* e da ATCC® 13637 determinados pela MIC..... 34
- Gráfico 2:** Cinética de formação de biofilme de quatro isolados clínicos de *S. maltophilia* (13P, 24F, 138 e 152) e da amostra de referência ATCC. 37
- Gráfico 3:** Susceptibilidade aos antimicrobianos do biofilme de *S. maltophilia* em biofilme (MIC-b) em diferentes tempos de maturação do biofilme (4, 6 e 24h). 41

LISTA DE SIGLAS

ATCC - Coleção de Microrganismos Norte Americana (do inglês, *American Type Culture Collection*)

BGNs - Bacilos gram-negativos

BGN-NF - Bacilos gram-negativos não fermentadores

BHI - *Brain Heart Infusion*

BIOMA-Lab - Laboratório de Biologia de Microrganismos e Antimicrobianos

BrCAST – *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

CAMHB - Caldo Mueller Hinton II ajustado com cátions

CAZ - Ceftazidima

CC - Controle de crescimento

CE - Controle de esterilidade

CHL - Cloranfenicol

CLSI - Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas (do inglês, *Clinical & Laboratory Standards Institute*)

CVC - Cateter venoso central

DNA - Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *DeoxyriboNucleic Acid*)

DO - Densidade óptica

ERIC PCR - *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR fingerprinting*

EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FAPES - Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo

FC - Fibrose Cística

GEN - Gentamicina

LVX - Levofloxacina

MIC - Concentração mínima inibitória (do inglês, *Minimum Inhibitory Concentration*)

MIC-b - Concentração mínima inibitória do biofilme

MIC-bv - Concentração mínima que inibe visualmente o biofilme

PCR - Reação em cadeia pela polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

PFGE - Eletroforese em campo pulsado (do inglês, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*)

RNA - Ácido ribonucleico

rpm –Rotações por minuto

STX - Trimetoprim-sulfametoxazol

TBE (Tris-Borato-EDTA)

TSB - Caldo triptona de soja (do inglês *Tryptic Soy Broth*)

UFC/mL - Unidades formadoras de colônia por mililitro

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

LISTA DE UNIDADE DE MEDIDAS

% - por cento

°C - graus Celsius

g - força gravitacional

h - horas

kb - quilobase

mg – miligrama

mL - mililitro

mm - milímetro

mM - milimolar

nm - nanômetro

ng - nanograma

pb - pares de base

p/v - partes por volume

U - unidade

v/v - volume por volume

µg - micrograma

µg/mL - micrograma por mililitro

µL - microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
ASPECTOS GERAIS DE <i>STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA</i> E IMPORTÂNCIA CLÍNICA	15
BIOFILME COMO FATOR DE VIRULÊNCIA	16
DINÂMICA DA FORMAÇÃO DO BIOFILME.....	16
BIOFILME EM CATETER.....	17
TERAPIA ANTIMICROBIANA DAS BACTEREMIAS NO PACIENTE EM HEMODIÁLISE.....	18
2. OBJETIVOS	20
Geral:	20
Específicos:.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1. Tipo de estudo.....	21
3.2. Amostras bacterianas.....	21
3.3. Confirmação da identificação das amostras por testes fenotípicos	21
3.4. Identificação molecular de <i>S. maltophilia</i>	22
3.5. Tipagem molecular por ERIC PCR	22
3.6. Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de <i>S. maltophilia</i> na forma planctônica.	23
3.7. Ensaio de produção de biofilme	26
3.8. Cinética de formação de biofilme	27
3.9. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de <i>S. maltophilia</i> em biofilme. ..	28
3.10. Compilação de dados e análise estatística	29
4. RESULTADOS	31
4.1. Identificação das amostras clínicas	31
4.1.2. Testes fenotípicos	31
4.1.3. Testes moleculares	32
4.2. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos	33
4.3. Produção de biofilme.....	36
4.4. Dinâmica de formação de biofilme.....	36
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	50
7. REFERÊNCIAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

ASPECTOS GERAIS DE *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* E IMPORTÂNCIA CLÍNICA

Stenotrophomonas maltophilia é uma bactéria gram-negativa não fermentadora de carboidratos, em forma de bastonete, obrigatoriamente aeróbica com flagelos polares, classificada na subdivisão γ - β de Proteobactérias (ANZAI *et al.*, 2000; HUGH; LEIFSON, 1963). Em 1943, foi isolada pela primeira vez, sendo chamada de *Pseudomonas maltophilia* (HUGH; LEIFSON, 1963), depois recebeu o nome de *Xanthomonas maltophilia* e após o sequenciamento da região 16S do rRNA foi identificada como *Stenotrophomonas maltophilia* (PALLERONI; BRADBURY, 1993).

S. maltophilia é um microrganismo de origem ambiental, mas que tem sido encontrada no ambiente hospitalar, seja em torneiras e reservatórios de água, aparelhos de respiração, pias, cateteres de sucção e, ocasionalmente, de culturas das mãos de profissionais da saúde (MARSHALL, 1989; ROBIN; JANDA, 1996; OLIVEIRA-GARCIA *et al.*, 2002). Trata-se de um patógeno que coloniza pacientes em cuidados intensivos, especialmente aqueles com condições debilitantes subjacentes, tais como imunossupressão, malignidades e com implantes e uso de dispositivos invasivos como cateteres e equipamentos de terapia respiratória (BONAVENTURA *et al.*, 2004; GILLIGAN *et al.*, 1999; WAKINO *et al.*, 2009; XUN *et al.*, 2014; WHITBY *et al.*, 2000). De fato, nas últimas décadas, *S. maltophilia* tem sido isolada de bacteremias relacionadas ao uso de cateter, septicemias, infecções das vias urinárias e do trato respiratório, além de endocardites em pacientes imunossuprimidos (DENTON; KERR, 1998; SENOL, 2004). Além disso, *S. maltophilia* é importante agente etiológico de infecções crônicas do trato respiratório de pacientes com fibrose cística (FC) (SINGH *et al.*, 2000; BJARNSHOLT *et al.*, 2009; BALLESTERO *et al.*, 1995; STEINKAMP *et al.*, 2005).

As taxas de mortalidade relatadas para os pacientes infectados com *S. maltophilia* variam de 23% a 77% (SAFDAR; ROLSTON, 2007; LOONEY *et al.*, 2009). O tratamento da infecção por *S. maltophilia* tem-se revelado cada vez mais difícil devido à resistência intrínseca das bactérias à múltiplas drogas, como aos β -lactâmicos, às quinolonas e aos aminoglicosídeos. Este fenótipo

de resistência é determinado pela produção de enzimas inativadoras de fármacos, redução da permeabilidade da membrana externa e expressão de um sistema de efluxo de drogas (SÁNCHEZ et al., 2002). Tais determinantes de resistência são adquiridos pela transferência de genes (BLAHOVÁ et al., 1997), mediada por plasmídeos (ZHANG et al., 2000).

BIOFILME COMO FATOR DE VIRULÊNCIA

Uma característica significativa de *S. maltophilia* é sua capacidade de adesão à superfícies bióticas e abióticas e a formação de biofilme (DENTON et al., 2003). Os biofilmes são constituídos por uma comunidade bacteriana estruturada e séssil revestida por uma matriz polimérica autoproduzida composta por polissacarídeos e proteínas (SINGH et al., 2000; BJARNSHOLT et al., 2009). Os microrganismos nesta comunidade são aderidos entre si e à uma superfície. No biofilme as bactérias estão protegidas de defesas imunes naturais do hospedeiro e da ação de compostos antimicrobianos (COSTERTON; LEWANDOWSKI, 1995; DONLAN, 2002). A menor susceptibilidade aos antimicrobianos de células em biofilme se deve a múltiplos fatores, como: (i) difusão desigual do antimicrobiano pela matriz do biofilme que se comporta como uma barreira; (ii) crescimento lento da bactéria no biofilme devido à limitação de nutrientes; (iii) diferenças em oxigenação e pH dentro do biofilme que poderiam diminuir a atividade dos antimicrobianos (STEWART, 1996; MAH; O'TOOLE, 2001).

DINÂMICA DA FORMAÇÃO DO BIOFILME

Segundo Consterton (1999) e Becker (2014) a formação do biofilme pode ser dividida em quatro etapas. Em primeiro lugar, as bactérias rapidamente se ligam à superfície biótica ou abiótica. No segundo passo, após se ligarem, as bactérias se multiplicam e se acumulam em agregados de células multicamadas, um processo que requer adesão intercelular. Na terceira fase, o biofilme cresce e amadurece em uma camada grossa e estruturada. Um biofilme maduro contém canais que são preenchidos com fluidos para garantir a entrega de oxigênio e nutrientes para as células bacterianas localizadas nas camadas mais profundas do biofilme. Finalmente, células únicas ou aglomerados celulares podem dissociar-se do biofilme e disseminar através da

corrente sanguínea para iniciar a colonização e a formação de biofilmes em um local diferente.

A adesão bacteriana é o primeiro passo para a colonização de superfícies mucosas ou próteses e formação do biofilme. Estudos mostram que linhagens de *S. maltophilia*, tanto de origem clínica como ambiental, se aderem a superfícies bióticas e abióticas, incluindo teflon, plástico, vidro, tecido epitelial do hospedeiro e dispositivos intravasculares (OLIVEIRA-GARCIAL et al., 2003). Pouco depois da inserção de um dispositivo intravascular, ele é coberto com um filme condicionante composto por colágeno, plaquetas e proteínas plasmáticas, como fibrinogênio, fibronectina, trombospondina e vitronectina. Alguns desses fatores do hospedeiro podem servir como receptores para a fixação dos microrganismos que expressam as respectivas adesinas em sua superfície.

As linhagens de *S. maltophilia* se aderem a superfícies de poliestireno em 2h ou 4h após inoculação e a fase exponencial de crescimento ocorre após 8h de incubação (BONAVENTURA et al., 2004; WANG et al., 2016). O crescimento máximo pode ser alcançado após cerca de 18h (fase do platô) e a formação do biofilme maduro pode ser observada entre 18 e 24h (BONAVENTURA et al., 2004; WANG et al., 2016).

BIOFILME EM CATETER

As infecções relacionadas ao cateter venoso central (CVC) são a causa mais freqüente de bacteremia adquirida no hospital em pacientes criticamente doentes. Ao longo das últimas duas décadas, a incidência de bacteremia relacionada ao CVC devido aos bacilos gram-negativos (BGNs) aumentou. Entre os BGN não fermentadores (BGN-NF), *S. maltophilia* é o patógeno mais frequentemente isolado (LAI et al., 2004). Em um estudo realizado em nove hospitais de ensino na França que incluíram 158 pacientes, *S. maltophilia* foi o BGN-NF mais isolado (39%) de pacientes hospitalizados (FIHMAN et al., 2012). Um estudo de Arvanitidou e colaboradores (2003) sugere que a água para diálise pode ser fonte de infecção da corrente sanguínea de pacientes em hemodiálise por várias espécies de BGN-NF, incluindo *S. maltophilia*, o segundo microrganismo mais encontrado.

Um agravante nas infecções de corrente sanguínea em pacientes em hemodiálise é a possível formação de biofilme em cateteres pelos microrganismos. O biofilme é um fator de virulência importante no contexto da hemodiálise, pois propicia um ambiente favorável a infecções persistentes e a indução excessiva da resposta inflamatória em pacientes naturalmente debilitados pela doença renal crônica, levando a uma maior taxa morbidade e mortalidade (SUMAN et al., 2013).

Caso o material colonizado não seja removido, a comunidade bacteriana pode atingir a corrente sanguínea e replicar o biofilme em órgãos e tecidos, levando geralmente o paciente a um quadro de septicemia (LI et al., 2000; BETJES; AGTEREN, 2004).

TERAPIA ANTIMICROBIANA DAS BACTEREMIAS NO PACIENTE EM HEMODIÁLISE

A *S. maltophilia* apresenta significativa ocorrência em bacteremias em pacientes em tratamento hemodialítico. Em estudo de Vincenti e colaboradores, 2014, *S. maltophilia* foi uma das quatro espécies de bacilos Gram-negativos não fermentadores mais prevalentes em amostras de água (água da torneira, água usada para hemodiálise e água de lavagem de broncoscópio) de diferentes enfermarias de um hospital terciário em Roma, Itália. Na unidade de hemodiálise, metade das amostras eram multidrogaresistentes (MDR) e a outra metade era extensivamente resistente (XDR) (VINCENTI et al., 2014).

Quando há falhas no sistema de purificação de água de diálise, o microrganismo pode alcançar o acesso vascular dos pacientes onde encontra sítio favorável à sua adesão e colonização, especialmente quando este se trata de cateteres de longa permanência (ARVANITIDOU, M et al., 2003). Após a adesão inicial será estabelecido o biofilme que será o foco das bacteremias nestes indivíduos. Kataria e colaboradores (2015) indicam a necessidade de remoção do cateter que abriga o biofilme e o uso de terapia antimicrobiana para se tratar a infecção por *S. maltophilia*. Entretanto, em algumas condições clínicas, a remoção do cateter é vista como última alternativa para eliminar a infecção, pois a troca do mesmo pode ser inviável em pacientes que tem

fragilidade vascular e que, por este motivo, não conseguem maturar uma fístula arteriovenosa, que é o acesso vascular mais seguro contra infecções. Desse modo, o tratamento destas bacteremias é, inicialmente, empírico, e por vezes, inclui o uso de vancomicina para cobertura dos Gram-positivos mais um aminoglicosídeo ou beta-lactâmico contra os Gram-negativos (HAN, LIANG e MARSCHALL, 2010). Entretanto em sendo *S. maltophilia* o agente etiológico da infecção, as opções de antimicrobianos se limitam à sulfametoxazol-trimetoprim, ceftazidima, levofloxacina, minociclina e cloranfenicol (CLSI, 2018), nenhum deles incluídos no clássico esquema de tratamento empírico

Atualmente, o trimetoprim-sulfametoxazol é considerado o medicamento de escolha, com base em sua excelente atividade *in vitro* contra *S. maltophilia* (KERR, 1996; OLIVEIRA-GARCIA et al., 2002). Alguns estudos têm mostrado que uma terapia mais prolongada com associação de ceftazidima mais SXT ou amicacina, é capaz de eliminar a infecção por *S. maltophilia* mantendo o cateter (BAEK et al., 2004; TZANETOU et al., 2004, LEE et al., 2009). Entretanto, pouca informação existe sobre a atividade de SXT sobre biofilmes de *S. maltophilia* (HERRERA-HEREDIA et al., 2017). Pompilio et al (2010) demonstrou que as fluoroquinolonas possuem alta atividade contra infecções causadas pela formação de biofilmes de *S. maltophilia*, enquanto Bonaventura (2004) encontrou que para afetar um biofilme produzido por *S. maltophilia*, é necessário altas concentrações de ceftazidima.

De fato, há escassez de informação sobre a atividade de antimicrobianos sobre biofilmes de *S. maltophilia*. Assim, considerando a reduzida atividade dos antimicrobianos contra microrganismos em biofilme e do limitado arsenal de fármacos anti-*S. maltophilia*, nos propusemos a investigar a atividade anti-biofilme de todos aos antimicrobianos indicados pelo CLSI sobre o biofilme de *S. maltophilia* em diferentes estágios de formação.

2. OBJETIVOS

Geral:

Avaliar o efeito de antimicrobianos sobre biofilmes de *Stenotrophomonas maltophilia* em diferentes estágios de formação.

Específicos:

1. Determinar o padrão de similaridade genética entre os isolados clínicos de *S. maltophilia*.
2. Caracterizar os isolados clínicos de *S. maltophilia* quanto à produção de biofilme.
3. Caracterizar a cinética de formação de biofilme em *S. maltophilia*.
4. Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *S. maltophilia* na forma planctônica
5. Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *S. maltophilia* em biofilmes nas fases de adesão, crescimento exponencial e maturação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Tipo de estudo

Trata-se de um estudo descritivo da susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados clínicos de *Stenotrophomonas maltophilia* na forma planctônica e em diferentes fases de formação de biofilme.

3.2. Amostras bacterianas

Inicialmente, foram incluídas neste estudo 22 amostras bacterianas previamente identificados como *Stenotrophomonas maltophilia*, além da amostra de referência *S. maltophilia* ATCC® 13637. Estes microrganismos foram isolados de bacteremias de pacientes em tratamento hemodialítico entre novembro de 2013 e novembro de 2014 em projeto anterior intitulado “Bacteremia em pacientes submetidos à hemodiálise na grande Vitória, ES: aspectos microbiológicos e terapêuticos” (aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CCS/Ufes: protocolo nº 219/11), e fazem parte da coleção de culturas do Laboratório de Biologia de Microrganismos e Antimicrobianos (BioMA-lab) do Departamento de Patologia do CCS/Ufes. As culturas bacterianas foram previamente identificadas em laboratório conveniado às unidades de coleta de maneira automatizada e, quando recebidos no BioMA-lab foram submetidas a testes bioquímicos no sistema semi-automatizado Bactray® 1 e 2 (Laborclin) para confirmação da identificação e depois estocadas em meio de preservação (proteose peptona, fosfato de potássio dibásico anidro, fosfato de potássio monobásico, cloreto de sódio P.A., glicerol e água destilada) a -20°C.

3.3. Confirmação da identificação das amostras por testes fenotípicos

As amostras bacterianas foram inoculadas em ágar BHI (Brain Heart Infusion) (Fluka™) suplementado com 5% de sangue e em ágar MacConkey (Himedia) e incubadas a 37°C por 18-24h. Em seguida foi feito um repique em ágar BHI e incubadas a 37°C por 18-24h. Após o crescimento das colônias, foi realizado um esfregaço em lâmina para coloração pelo método de Gram. Em seguida foi realizado teste de oxidase, DNase e de fermentação de glicose (KONEMAN et al., 2008).

3.4. Identificação molecular de *S. maltophilia*

As amostras foram cultivadas *overnight* em ágar BHI e 15 colônias foram suspensas em 100µL de água purificada em sistema Milli-Q (*Millipore Corporation*). Os tubos foram homogeneizados em vórtex e mantidos à temperatura de ebulição, em torno de 100°C, por 15 minutos. Logo após esfriarem foram centrifugados (Sigma 2k15) durante 5 minutos a 15 000 g. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer – 20°C para posterior utilização na reação em cadeia pela polimerase (PCR) (NUNVAR et al., 2011).

Na reação de PCR foram utilizados dois *primers*, SM1 (CAGCCTGCGAAAAGTA) e SM4 (TTAAGCTTGCCACGAACAG) (WHITBY et al, 2000) para amplificar a região 23S do RNA ribossômico, e 40 ng de DNA com um volume final de 50 µL. A reação foi realizada conforme a indicação do fabricante do mix Readymix™ (Sigma-Aldrich®). A *S. maltophilia* ATCC® 13637 foi utilizada como controle positivo e o mix sem adição de DNA foi utilizado como controle negativo.

Os microtubos foram inseridos no Termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific®) para realização dos ciclos: (a) desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; (b) 25 ciclos a 94°C por 1 minuto (desnaturação), 55°C por 2 minutos (hibridização dos *primers*) e (c) 25 ciclos a 72°C por 3 minutos (extensão). Após o último ciclo foi realizada a extensão a 72°C por 5 minutos. Em seguida, o produto da PCR foi aplicado em gel de agarose a 2% (p/v) contendo 10mg/mL de Brometo de Etídio e submetido à eletroforese em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA). A visualização das bandas foi realizada com luz ultravioleta em equipamento Mini Bis Pro Image Analysis Systems (DNR Bio Imaging Systems®). No mesmo gel, foram adicionadas amostra controle negativo (mix da PCR sem adição do DNA), e os marcadores de tamanho molecular (DNA *Ladder*, com intervalo de 50pb – Promega). O produto da PCR esperado, consistiu em um fragmento de 531 pb.

3.5. Tipagem molecular por ERIC PCR

A similaridade genética entre as amostras clínicas de *S. maltophilia* foi avaliada por *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR fingerprinting* (ERIC PCR) usando *primers* descritos por Versalovic et al (1991).

A reação para a PCR foi preparada num volume total de 25 µl contendo: 40 ng/µl de DNA, 1,25 mM de cada desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP) (Sinapse), 10x Tampão de PCR (Mg²⁺ Plus) (Sinapse), 25 mM de MgCl₂ (Sinapse), mais 2U de Taq DNA polimerase Platinum (Sinapse) e 8 mM de cada primer, ERIC1R (CACTTAGGGGTCCTCGAATHTA) e ERIC2 (AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG), (Thermo Fisher Scientific) (VERSALOVIC et al., 1991; GALLO et al., 2016).

As amplificações foram realizadas em um termociclador (Bio-Rad T100™ thermal cycler) com uma desnaturação inicial (95°C, 7 minutos) seguido de 30 ciclos de desnaturação (95°C, 30 segundos), hibridização (48°C, 30 segundos) e extensão (72°C, 2 minutos) com uma extensão final (72°C, 10 minutos).

Os produtos ERIC-PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v) corados com 0,5 mg/ml de brometo de etídio e as bandas foram visualizadas usando luz ultravioleta em Sistemas de Análise de Imagem Mini Bis Pro (DNR Bio Imaging Systems®). No mesmo gel, foram adicionadas amostra controle negativo (mix da PCR sem adição do DNA), e os marcadores de tamanho molecular (DNA *Ladder*, com intervalo de 100pb e o segundo de 1Kb – Promega).

Através do *software* Gel J versão 2.0 foi possível a geração de um dendograma para análise do padrão de bandas formado (HERAS et al., 2015).

3.6. Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *S. maltophilia* na forma planctônica.

Neste teste utilizamos o método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (MIC do inglês – *minimum inhibitory concentration*) conforme CLSI (2018). Foram testados os antimicrobianos trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), ceftazidima, levofloxacina e cloranfenicol. A gentamicina, embora não seja sugerida para testes contra *S. maltophilia* CLSI (2018), também foi incluída no estudo devido ao seu uso na terapia empírica das bacteremias dos pacientes em hemodiálise. Todos os antimicrobianos foram adquiridos da Sigma-Aldrich®.

3.6.1. Preparo da solução estoque dos antimicrobianos

Para o cálculo da quantidade do antimicrobiano a ser utilizado no preparo da solução estoque aplicou-se a Equação 1, descrita abaixo:

$$Peso (\mu g) = \frac{\text{volume (mL)} \times \text{concentração } (\mu g/mL)}{\text{Potência}} \quad \text{Equação 1}$$

Considerando a potência de cada antimicrobiano, fornecida pelo fabricante, foi feita a pesagem do pó e sua solubilização em água estéril.

As soluções estoque foram preparadas na concentração de 1000 µg/mL (cloranfenicol, levofloxacina e trimetoprim) e 2000µg/mL (ceftazidima, sulfametoxazol e gentamicina). A solução estoque foi alíquotada, congelada (-20°C) e utilizada nos ensaios dentro do prazo de 30 dias, conforme instrução do fabricante.

As diluições de cada antimicrobiano foram realizadas para que cada um contemplasse a faixa de concentração apropriada para determinação da MIC de cada linhagem controle, além de incluir os pontos de corte para sensibilidade e resistência indicados pelo CLSI (2018) (Quadro 1). Para a interpretação da MIC de gentamicina foram utilizados os pontos de corte para as não *Enterobacteriaceae*.

Quadro 1: Pontos de corte para os critérios interpretativos da susceptibilidade de *S. maltophilia*, o MIC dos controles utilizados neste estudo e a faixa de diluição dos antimicrobianos.

Antimicrobianos	Pontos de corte (µg/mL) <i>S. maltophilia</i>			Faixa de MIC (µg/mL) dos controles de qualidade		Faixas de diluições (µg/mL) utilizadas para o teste do MIC
	S	I	R	<i>Escherichia coli</i> ATCC®25922	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC® 27853	
Cloranfenicol	≤ 8	16	≥32	2-8	-	0,06 - 32
Levofloxacina	≤ 2	4	≥8	-	0,5-4	0,06 - 16
Ceftazidima	≤ 8	16	≥32	-	1-4	0,12 - 256
SXT	≤2/38	-	≥4/76	<0,5/9,5	-	0,03/0,6 - 16/304
Gentamicina	≤4	8	≥16	-	0,5-2	0,5 - 256

S= sensível, I=Intermediária, R= resistente

SXT: sulfametoxazol-trimetoprim

3.6.2. Microdiluição em caldo

Os testes foram realizados em microplacas estéreis de poliestireno de 96 poços (Cralplast) em caldo Müller-Hinton II ajustado com cátions (CAMHB) (Difco). O meio foi preparado com a solubilização em água destilada, sendo posteriormente autoclavado durante 15 minutos a uma temperatura de 121°C. Inicialmente foram adicionados 50 µL de CAMHB em cada poço da placa, com exceção da coluna 1, onde foram adicionados 100 µL da solução de antimicrobiano (diluído no meio) na concentração máxima a ser testada e 100µL na coluna 12 (controle de esterilidade - CE). A partir da coluna 1, foi feita a diluição seriada, transferindo-se 50 µL para a coluna seguinte, até a coluna 10 e desta, descartou-se 50 µL.

A penúltima coluna (coluna 11) foi destinada ao controle de crescimento (CC) da bactéria, contendo apenas o meio de cultura e a suspensão bacteriana. Na última coluna foi feito o CE do meio (Figura 1).

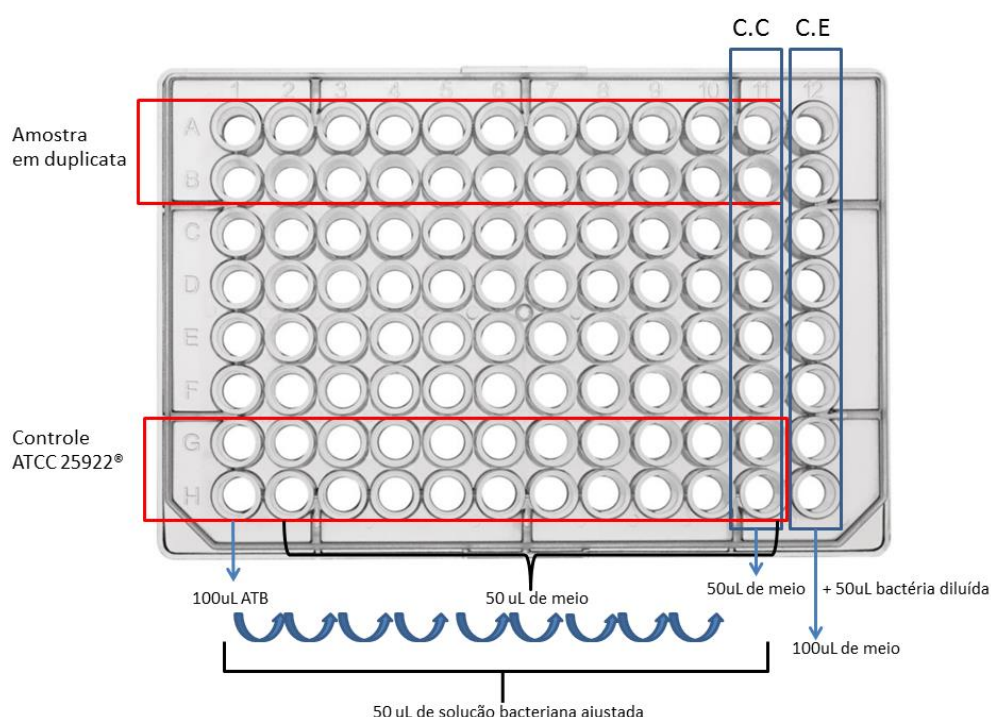


Figura 1: Esquema de preparação das microplacas para o teste de microdiluição para determinação do MIC de cada antimicrobiano.

Todas as 19 amostras clínicas mais a ATCC® 13637 foram incluídas neste ensaio. Foram adicionadas colônias cultivadas *overnight* em BHI, a uma solução de salina 0,9% (p/v) para o ajuste na escala 0,5 McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

Foram retirados 100 µL da suspensão bacteriana ajustada na escala 0,5 McFarland e diluídos em 9,9 mL de CAMHB (diluição 1:100). Após a diluição seriada do antimicrobiano, 50 µL das suspensões bacterianas foram adicionadas nos poços das colunas 1 até 11 (inóculo final $\cong 7,5 \times 10^5$ UFC/ML) e o último poço foi destinado ao controle negativo, contendo somente o meio de cultura.

Para controle de qualidade do teste foram usadas as amostras de referência *Escherichia coli* ATCC® 25922 e *P. aeruginosa* ATCC® 27853. Ao final, as placas foram incubadas em estufa, a 37°C durante o período de 18 – 24 horas, conforme indicação do CLSI (2018). Passado o tempo de incubação, a leitura foi realizada e o MIC foi definido como a menor concentração do antimicrobiano que inibiu o crescimento visível do microrganismo.

3.7. Ensaio de produção de biofilme

O ensaio de detecção de biofilme foi executado a partir de uma adaptação do protocolo descrito por Wang et al (2016). Todas as 19 amostras clínicas mais a ATCC® 13637 foram incluídas neste ensaio. Após confirmação da pureza das amostras, cerca de vinte colônias foram inoculadas em caldo tripton de soja (TSB) e incubado à 37°C por 24 horas. A concentração bacteriana foi ajustada para a densidade ótica (D.O.) de 0,241 ($1,83 \times 10^8$ UFC/mL) em 10 mL de TSB. Aliquotas de 15µL de cada suspensão bacteriana, foram inoculadas em cada poço de uma microplaca de poliestireno com 96 poços, exceto no CE, previamente preenchidos com 135 µL de TSB (inóculo final = 1.0×10^7 UFC/mL). Como controle negativo e positivo da produção de biofilme foram utilizadas as linhagens *E. coli* HB101 e EAEC 042, respectivamente. Estes controles foram gentilmente cedidos pela professora Liliana Cruz Spano do Laboratório de Gastroenterites Infeciosas da UFES. As microplacas foram seladas com plástico filme e incubadas à 37°C por 24 horas sob agitação orbital (125 rpm).

Após incubação, os poços foram lavados com PBS por duas vezes a fim de se remover bactérias em estado de vida planctônico. A biomassa aderida nos poços foi corada com 200 µL de cristal violeta 0,01% (p/v) por 20 minutos. Após este tempo, o corante foi removido e os poços lavados com água destilada por quatro vezes a fim de se remover o excesso de corante. Cerca de 200 µL de solução de etanol 95% (v/v) foi utilizada para dissolver o corante. Posteriormente a microplaca foi lida em espectrofotômetro Epoch 2 (Biotek®) no comprimento de onda de 492 nm. O experimento foi realizado em quadruplicata, em três dias diferentes. A média dos 03 valores de D.O. de cada cepa testada foi calculada. O *cutoff* (ct) para a produção de biofilme foi definido como a D.O. do controle negativo (cn) mais três vezes o desvio-padrão (DP) do controle negativo ($DO_{cn} + 3 \times DP_{cn}$). Para classificação de produção foram considerados os seguintes parâmetros: $DO_{ct} > DO_{amostra}$ (não produtor), $DO_{cn} < DO_{amostra} < 2 \times DO_{cn}$ (produtor fraco), $2 \times DO_{cn} < DO_{amostra} < 4 \times DO_{cn}$ (produtor moderado) e $DO_{amostra} > 4 \times DO_{cn}$ (produtor forte) (STEPANOVIC et al., 2007).

3.8. Cinética de formação de biofilme

O ensaio da cinética de formação do biofilme foi executado a partir de uma adaptação do protocolo descrito por Wang et al., 2016. Além da ATCC® 13637 foram selecionadas, aleatoriamente, quatro amostras clínicas (13P, 24F, 138 e 152) produtoras de biofilme para este estudo. Cerca de vinte colônias foram inoculadas em TSB e incubado à 37°C por 24 horas. A concentração bacteriana foi ajustada para a D.O. de 0,241 ($1,83 \times 10^8$ UFC/mL) em 10 mL de TSB. Alíquotas de 15 µL de cada suspensão bacteriana foram inoculadas em cada poço de uma microplaca de poliestireno com 96 poços, exceto no CE, previamente preenchidos com 135 µL de TSB (inóculo final = 1.0×10^7 UFC/mL). Foram montadas sete microplacas réplicas que foram seladas com plástico filme e incubadas à 37°C sob agitação orbital (125 rpm). A cada 2 horas (durante 12 horas e depois com 24 horas) uma placa era retirada da estufa para a avaliação da formação de biofilme por meio de lavagem dos poços, coloração da biomassa com cristal violeta e leitura da densidade ótica, conforme descrito anteriormente (item 3.7).

3.9. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *S. maltophilia* em biofilme.

3.9.1 Determinação da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos contra biofilme de 24h por inspeção visual (MIC-bv)

Foram testadas as 19 amostras clínicas de *S. maltophilia* mais a ATCC® 13637, todas em biofilme de 24h. Os antimicrobianos testados foram os mesmos utilizados na determinação do MIC das formas planctônicas (item 3.6). O biofilme foi pré-formado em microplacas de 96 poços, conforme descrito no item 3.7. O meio foi aspirado e os poços foram lavados com salina estéril por 2 vezes para remover as células planctônicas, restando somente o biofilme aderido aos poços. Em outra placa 96 poços, estéril, fez-se a diluição seriada do antimicrobiano, como brevemente descrito: Com exceção da coluna 1, todas as demais receberam 100µL de meio CAMHB. Na coluna 1 foi adicionado 200µL da solução de antimicrobiano na concentração máxima a ser testada (4096 µg/mL para cloranfenicol, levofloxacina, ceftazidima e gentamicina e 128/2432 µg/mL para SXT) e transferidos 100µL para a coluna seguinte, até a 11ª, de onde foi descartado 100µL. O conteúdo desta placa foi transferido para a placa com o biofilme pré-formado. A última coluna foi destinada ao CE do meio e a penúltima ao CC. As placas foram cobertas com plástico filme e incubadas em estufa, a 37°C durante o período de 18 – 20h. Após a incubação, foi feita a inspeção visual do crescimento e determinada a concentração inibitória mínima dos antimicrobianos contra biofilme de 24h (MIC-bv). O MIC-bv foi definido como a menor concentração do antimicrobiano que inibiu o estabelecimento de uma população de bactérias planctônicas a partir de bactérias em biofilme (ROSSI et al., 2009).

3.9.2 Determinação da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos contra biofilmes em diferentes estágios de formação (MIC-b).

Neste ensaio foram testadas três amostras clínicas (138, 152 e 160), selecionadas por apresentarem sensibilidade a todos aos antimicrobianos na forma planctônica, mais a ATCC® 13637, igualmente sensível. Os antimicrobianos foram testados contra biofilmes na fase de adesão (4h),

crescimento (6h) e maturação (24h), conforme determinado no ensaio de cinética de formação do biofilme. Ou seja, os biofilmes foram pré-formados por 4, 6 e 24 horas em microplacas de 96 poços, conforme descrito no item 3.8. Após cada tempo de incubação, o meio foi aspirado e os poços foram lavados com salina estéril por duas vezes para remover as células planctônicas, restando somente o biofilme aderido aos poços. Em outra microplaca de 96 poços, estéril, fez-se a diluição seriada do antimicrobiano. Para cada tempo de formação do biofilme foi definida uma faixa de concentração a ser testada para cada antimicrobiano, conforme quadro 2. As placas foram montadas conforme descrito no item 3.9.1, cobertas com plástico filme e incubadas a 37°C, durante 20h. Após a incubação, foi feita a leitura da D.O. a 492nm no equipamento EPOCH 2. O MIC-b foi definido como a menor concentração do antimicrobiano que reduz em 10 vezes ($1\log_{10}$ ou 90%) a DO_{492nm} do CC após 20h de incubação.

Quadro 2: Diluições seriadas utilizadas para o teste do MIC-b

Antimicrobianos	Tempo de biofilme formado (horas)	Faixas de concentrações ($\mu\text{g/mL}$)
Cloranfenicol	4	0,12 - 64
	6	8 - 4096
	24	8 - 4096
Levofloxacina	4	0,25 - 128
	6	8 - 4096
	24	8 - 4096
Ceftazidima	4	8 - 4096
	6	8 - 4096
	24	8 - 4096
SXT	4	0,25/4,74 – 128/2432
	6	0,25/4,74 – 128/2432
	24	0,25/4,74 – 128/2432
Gentamicina	4	1 - 512
	6	8 - 4096
	24	8 - 4096

3.10. Compilação de dados e análise estatística

Utilizamos estatística descritiva para apresentar os dados de susceptibilidade aos antimicrobianos tanto das amostras na forma planctônica (MIC_{50} e MIC_{90})

quanto em biofilme (MIC-bv e MIC-b) e também da cinética de produção de biofilme (média e desvio padrão). Para determinação do MIC-b utilizamos valores médios de DO para cálculo da redução de 1 log da DO do controle. A comparação das médias do MIC-b dos diferentes antimicrobianos nos diferentes estágios de formação do biofilme foi feita pelo teste t de *students* (amostras pareadas) com $p < 0,05$ sendo significativo. Gráficos e análises estatísticas foram conduzidas nos programas Origin Pro 8 e Excel 10.

4. RESULTADOS

4.1. Identificação das amostras clínicas

4.1.2. Testes fenotípicos

De 22 amostras clínicas previamente identificadas como *S. maltophilia*, 19 foram confirmadas, apresentando as seguintes características fenotípicas: bacilos Gram-negativos, colônias de cor cinza e brilhantes em ágar sangue, lactose negativo em ágar MacConkey, DNase positiva, oxidase negativa e reação oxidativa para glicose em meio OF (Figura 2). *S. maltophilia* ATCC® 13637 foi utilizado como controle.

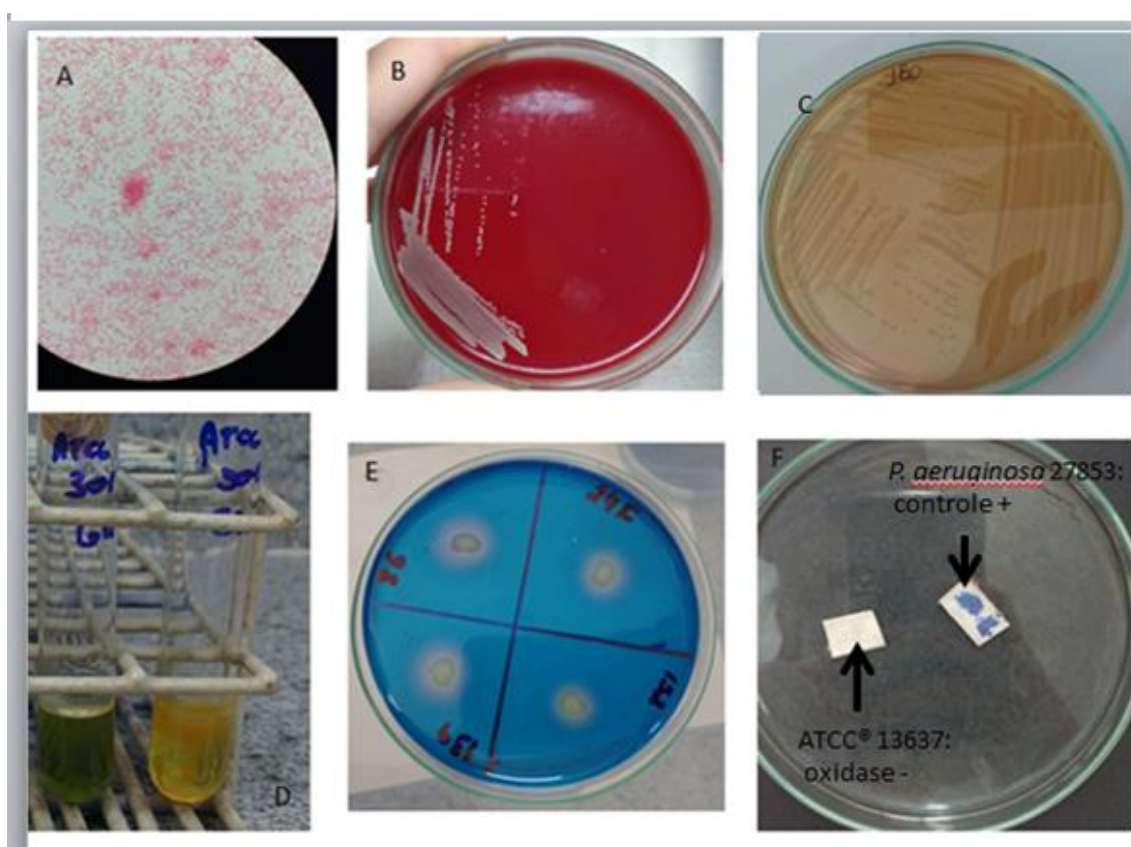


Figura 2: Identificação fenotípica de *S. maltophilia*. (A) Bacilos Coloração de Gram negativo, (B) colônias de cor cinza e brilhantes em ágar sangue, (C) lactose negativo em ágar MacConkey, (D) reação oxidativa para glicose em meio OF, (E) DNase positiva, (F) oxidase negativa.

4.1.3. Testes moleculares

4.1.3.1. PCR espécie-específica

Todas as 22 amostras foram submetidas à PCR espécie-específica direcionada ao gene 23S rRNA de *S. maltophilia*. Utilizando o par de iniciadores SM1-SM4 foi amplificada uma banda de 531 pb nos 19 isolados, com identificação confirmada nos testes fenotípicos (figura 3). Assim, os ensaios posteriores foram conduzidos com estas 19 amostras mais a amostra de referência *S. maltophilia* ATCC® 13637.

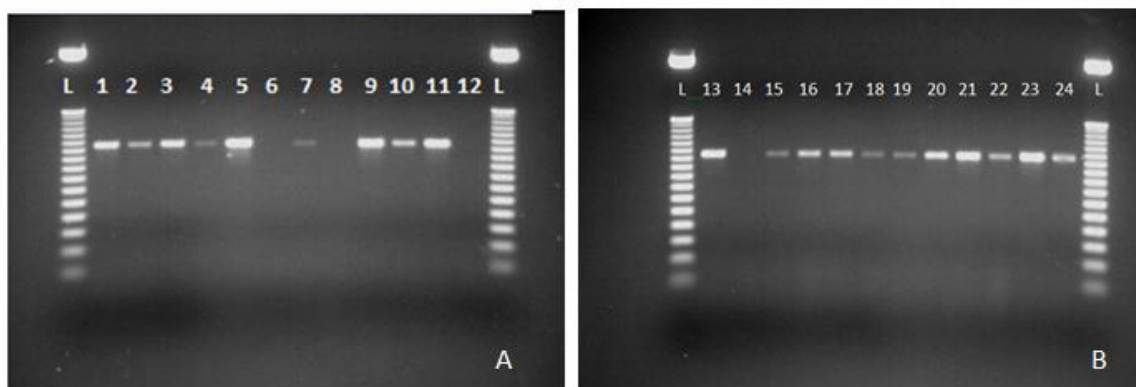


Figura 3: Gel representativo da PCR com os iniciadores SMI e SM4 da região 23S rRNA de *S. maltophilia*.

(L) ladder de 50pb. A amostra de referência ATCC® 13637 e as demais amostras clínicas estão representadas por números. Gel A: ATCC® (1), 59 (2), 82(3), 84B(4), 86(5), 93(6), 96(7), 110(8), 115(9), 118(10), 119(11), 129A(12). Gel B: ATCC® (13), 129b(14), 138(15), 139(16), 140(17), 152(18), 160(19), 180(20), 185(21), 189(22), 13P(23), 24F(24).

4.1.3.2. Tipagem molecular por ERIC-PCR

Em nosso estudo, os 19 isolados clínicos de *S. maltophilia* mostraram 15 *fingerprints* distintos, ou seja, 78% dos isolados geraram padrões de bandas diferentes, o que indica alta diversidade entre as amostras (figura 4).

Utilizando o ponto de corte de $\geq 80\%$ de similaridade entre as amostras para a formação de agrupamentos (HERAS et al., 2015; ZHUO et al., 2014), identificamos a presença de 5 padrões genéticos distintos (A-E) (figura 4). O padrão A alberga o maior número de linhagens (sete), com duas (180 e 59) apresentando 100% de similaridade, sendo diferenciadas fenotipicamente pela resistência a gentamicina (59). Apesar da similaridade, estas duas linhagens foram isoladas de pacientes diferentes, em clínicas de hemodiálise diferentes

com distância temporal de mais de 10 meses. O padrão B alberga 3 amostras, sendo duas com mais de 90% de similaridade e todas diferentes quanto ao perfil de resistência. O padrão C alberga 4 amostras, sendo 2 com 100% de similaridade (139 e 96) e todas resistentes a ceftazidima. Estas linhagens foram isoladas de dois pacientes diferentes em intervalo de, aproximadamente, 4 meses, porém na mesma clínica de hemodiálise. O padrão D alberga apenas duas 2 amostras, ambas fenotipicamente diferentes em relação à resistência à gentamicina. O padrão E alberga 3 amostras com 100% de similaridade (160, 152 e 138), todas sensíveis aos antimicrobianos, sendo isoladas na mesma clínica de hemodiálise em um intervalo de 56 dias. Duas delas (160 e 138) pertencentes ao mesmo paciente.

4.2. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os resultados de susceptibilidade aos antimicrobianos estão resumidos no gráfico 1 e tabela 1. Todas as amostras foram sensíveis ao trimetoprim-sulfametoxazol e à levofloxacina. O cloranfenicol foi o 3^a antimicrobiano com melhor atividade (19 amostras sensíveis e uma intermediária). Todos estes três antimicrobianos apresentaram valores de MIC₅₀ igual à MIC₉₀, indicando homogeneidade de susceptibilidade entre os isolados. Ceftazidima foi o antimicrobiano menos ativo contra *S. maltophilia*: 12 isolados resistentes (60%), 2 intermediários (10%) e 6 sensíveis (30%). As maiores variações de MIC também foram encontradas para ceftazidima. Quanto à gentamicina, 13 amostras foram sensíveis (65%), 3 intermediárias (15%) e 4 resistentes (20%).

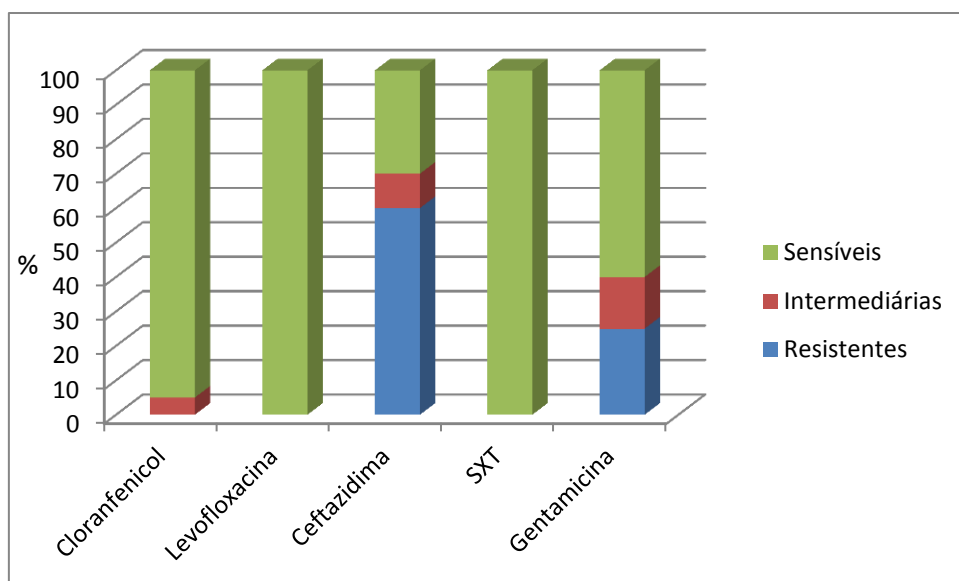


Gráfico 1: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de 19 amostras clínicas de *S. maltophilia* e da ATCC® 13637 determinados pela MIC.

Tabela 1: Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de células planctônicas de 19 amostras clínicas de *S. maltophilia*

Antimicrobianos	MIC (µg/mL)			Sensíveis % (N)
	Faixa	MIC ₅₀	MIC ₉₀	
Cloranfenicol	2 – 16	4	4	95 (19)
Levofloxacina	0,25 – 1	0.5	0.5	100 (20)
Ceftazidima	0,25 – 128	32	128	30 (06)
SXT	0,06/1,2 - 0,5/9,5	0,25/4,75	0,25/4,75	100 (20)
Gentamicina	1 – 64	4	16	65 (12)

MIC₅₀, MIC que inibe 50% dos isolados testados. MIC₉₀, MIC que inibe 90% dos isolados testados. As porcentagens de susceptibilidade foram calculadas com base nos pontos de corte sugeridos pelas diretrizes do CLSI (2018). SXT: sulfametoxazol/trimetoprim.

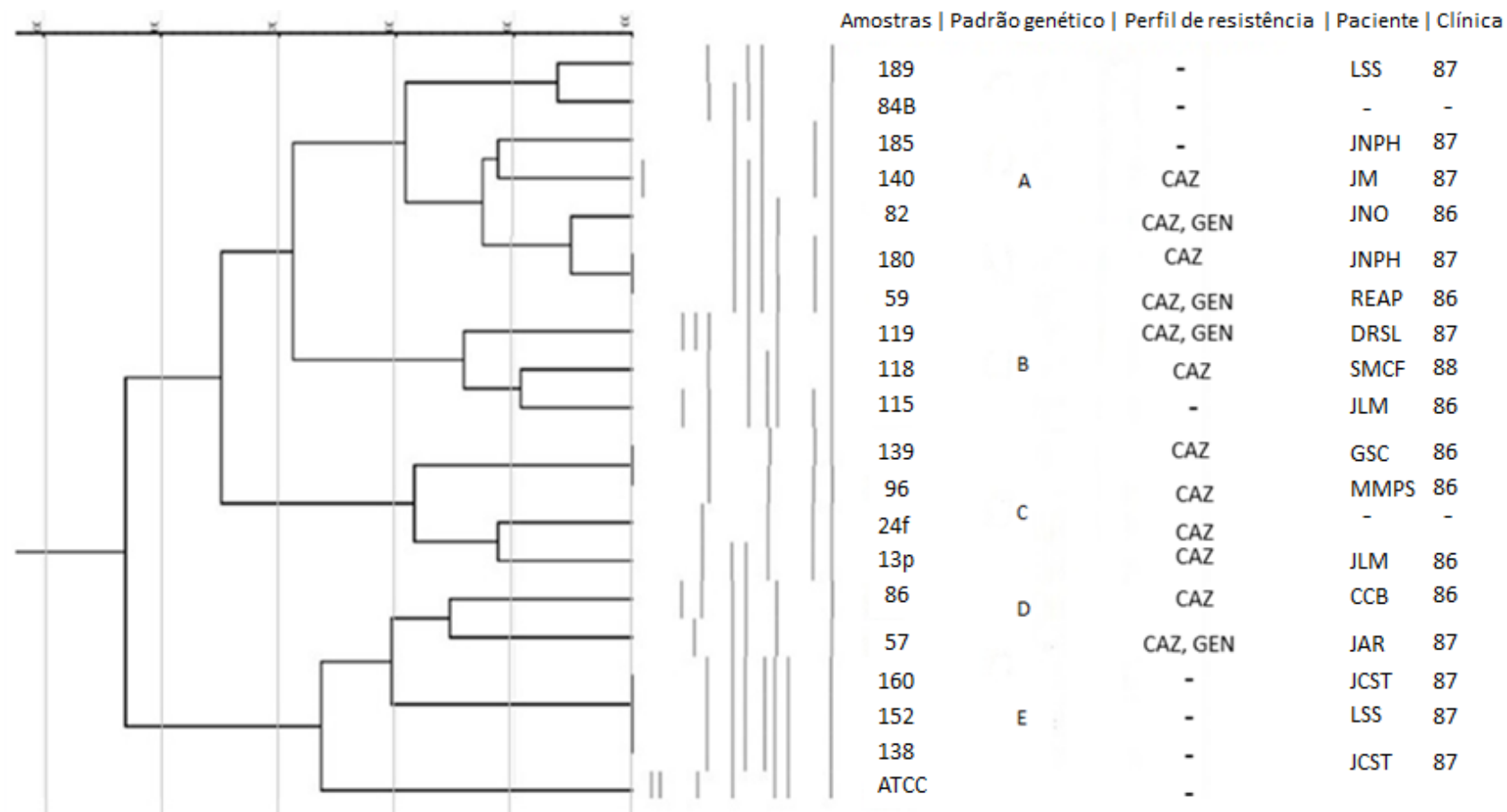


Figura 4: Dendrograma gerado baseado em fingerprint ERIC PCR de 19 isolados clínicos de *S. maltophilia* mais ATCC® 13637.

4.3. Produção de biofilme

A partir do método descrito por Wang et al (2016), detectamos que todas as amostras de *S. maltophilia* são produtoras de biofilme, em intensidade moderada, conforme classificação de Stepanovic et al (2007) (Figura 5).

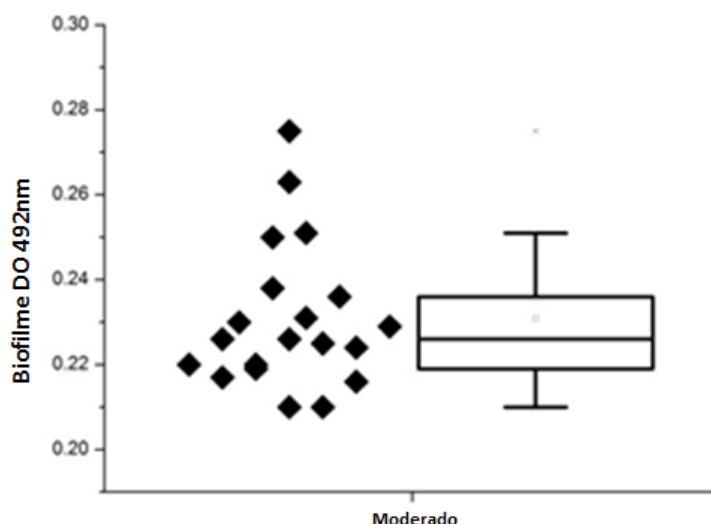


Figura 5: Distribuição das amostras clínicas de *S. maltophilia* (N= 19) mais a ATCC® 13637, quanto à intensidade de produção de biofilme. Todas foram produtoras de biofilme em intensidade moderada.

4.4. Dinâmica de formação de biofilme

Para entender a dinâmica da formação de biofilme, os valores da D.O. foram medidos em diferentes tempos para 4 amostras de *S. maltophilia*, selecionadas aleatoriamente. Os valores médios da DO são mostrados no gráfico 2, e revelam que a fase inicial de adesão celular ao poliestireno ocorreu até a 4^a hora de incubação. A fase exponencial de crescimento do biofilme ocorreu entre 4^a e 8^a hora e incubação. Finalmente, a fase de maturação ocorreu a partir da 8^a hora de incubação, alcançando um biofilme maduro em 24 horas.

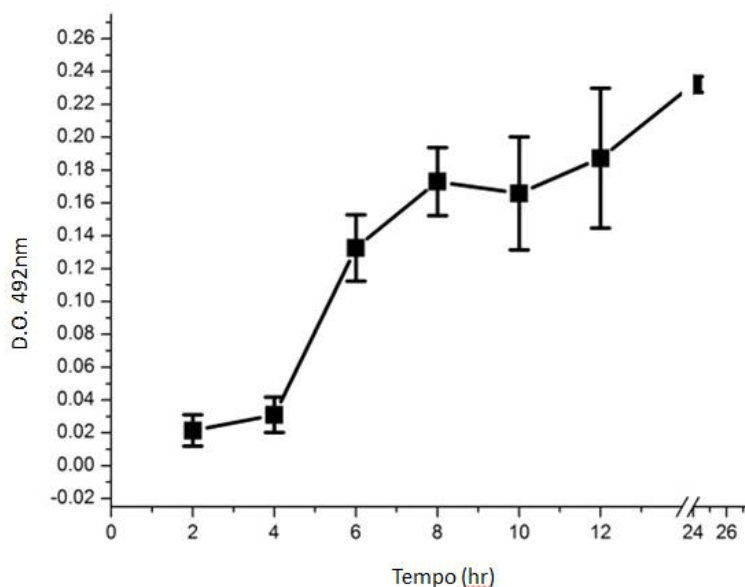


Gráfico 2: Cinética de formação de biofilme de quatro isolados clínicos de *S. maltophilia* (13P, 24F, 138 e 152) e da amostra de referência ATCC.

Os resultados são expressos como as médias das DOs \pm SDs a 492 nm.

A leitura visual da atividade dos antimicrobianos contra *S. maltophilia* em biofilme de 24h (MIC-bv) foi inconclusiva na maioria dos isolados, com valores maiores que 4096 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 2). Assim, decidimos testar a atividade dos fármacos nas fases de adesão, crescimento exponencial e maturação do biofilme. Além disso, utilizamos para interpretação da susceptibilidade de *S. maltophilia* em biofilme a redução de, pelo menos, 10 vezes ($1\log_{10}$ ou 90%) na densidade ótica em relação ao controle, após 20 horas de exposição aos antimicrobianos em diferentes concentrações (MIC-b). Na figura 6 temos um exemplo da interpretação do MIC-b de STX para a amostra de referência ATCC® 13637 nos tempos de 4, 6 e 24h de formação do biofilme.

Como esperado, a susceptibilidade aos antimicrobianos diminuiu com o tempo de formação do biofilme, ou seja, quanto mais bem estruturado o biofilme, menor a atividade dos antimicrobianos (gráfico 3b). No biofilme formado em 4 horas, os antimicrobianos com melhor atividade foram gentamicina e cloranfenicol, enquanto sulfametoxazol-trimetoprim apresentou a menor atividade contra *S. maltophilia*. Para o biofilme de 6 horas, novamente, gentamicina apresentou a melhor atividade, seguida de levofloxacina. Sulfametoxazol-trimetoprim continuou o menos eficaz. Contra o biofilme de 24 horas, gentamicina também exibiu melhor atividade, e

ceftazidima apresentou o pior resultado (gráfico 3). Estes dados são demonstrados pela razão MIC-b/MIC. Gentamicina apresentou menores valores de razão MIC-b/MIC. No biofilme de 4h apresentou valor de MIC-b apenas 0,5 vez maior do que o MIC. No biofilme em fase exponencial (6 horas) o MIC-b foi 5.65 vezes maior do que o MIC. Já na fase de maturação (24 horas), o MIC-b foi 38.05 vezes maior do que o MIC. Por outro lado, ceftazidima foi o antimicrobiano menos efetivo em biofilme na fase de maturação (24h) com MIC-b 2438 vezes maior que o valor de MIC. Para biofilmes nas fases de adesão e crescimento sulfametoxazol-trimetoprim foi o menos eficiente com valores de razão MIC-b/MIC de 90,59 e 430,97 respectivamente.

Os antimicrobianos foram ordenados de forma decrescente de atividade contra *S. maltophilia* em diferentes estágios de formação do biofilme na figura 7. Gentamicina se destaca por apresentar a melhor atividade em todos os tempos de formação do biofilme, embora não esteja listada entre os antimicrobianos anti-*S. maltophilia* nos manuais de padronização de testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, como CLSI, EUCAST e BrCAST. Por outro lado, sulfametoxazol-trimetoprim, que é o fármaco de 1ª escolha contra *S. maltophilia*, apresentou a pior atividade contra biofilmes de 4 e 6h ficando atrás apenas de ceftazidima como fármaco menos eficaz contra biofilmes maduros (24h).

Tabela 2: Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das amostras de *S. maltophilia* na forma plantônica (MIC) e em biofilme (MIC-bv)

Isolados	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)					MIC-bv ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) inspeção visual				
	CHL	LVX	CAZ	SXT	GEN	CHL	GEN	CAZ	LVX	SXT
ATCC® 13637	4	0,25	4	0,5/9,5	2	> 4096	> 4096	> 4096	> 4096	>128/2432
13p	4	0,5	32	0,25/4,75	2	> 4096	> 4096	> 4096	4096	>128/2432
24f	4	0,5	64	0,25/4,75	4	> 4096	> 4096	> 4096	4096	>128/2432
57	4	0,25	128	0,25/4,75	16	> 4096	> 4096	> 4096	> 4096	>128/2432
59	4	0,25	128	0,25/4,75	16	> 4096	> 4096	> 4096	4096	>128/2432
82	4	0,5	128	0,25/4,75	16	> 4096	> 4096	> 4096	4096	>128/2432
84b	4	0,5	16	0,25/4,75	2	> 4096	> 4096	> 4096	> 4096	>128/2432
86	4	0,5	128	0,25/4,75	4	> 4096	> 4096	> 4096	> 4096	>128/2432
96	4	0,5	128	0,12/2,4	8	> 4096	> 4096	> 4096	> 4096	>128/2432
115	16	1	2	0,25/4,75	1	> 4096	> 4096	> 4096	4096	>128/2432
118	4	1	64	0,25/4,75	8	> 4096	> 4096	> 4096	4096	>128/2432
119	4	0,5	128	0,25/4,75	64	> 4096	> 4096	> 4096	> 4096	>128/2432
138	4	0,25	4	0,25/4,75	4	> 4096	> 4096	> 4096	4096	>128/2432
139	4	0,5	32	0,5/9,5	1	> 4096	> 4096	> 4096	4096	>128/2432
140	4	0,5	32	0,06/1,2	4	> 4096	> 4096	> 4096	4096	>128/2432
152	4	0,25	0,25	0,25/4,75	1	> 4096	> 4096	> 4096	4096	>128/2432
160	4	0,25	2	0,25/4,75	2	> 4096	> 4096	> 4096	4096	>128/2432
180	4	0,5	128	0,12/2,4	4	> 4096	> 4096	> 4096	4096	>128/2432
185	4	0,5	16	0,25/4,75	4	> 4096	> 4096	> 4096	4096	>128/2432
189	4	0,25	2	0,25/4,75	8	> 4096	> 4096	> 4096	4096	>128/2432

Susceptibilidade aos antimicrobianos de formas planctônicas (MIC) e formas em biofilme de 24h de 19 isolados clínicos de *S. maltophilia* e a linhagem de referência determinada por inspeção visual (MIC-bv). MIC e MIC-bv foram definidos como as menores concentrações dos antimicrobianos que inibiram o crescimento visível. CHL: Cloranfenicol; LVX: Levofloxacina; CAZ: Ceftazidima; SXT: Trimetoprim-sufametoxazol; GEN: Gentamicina.

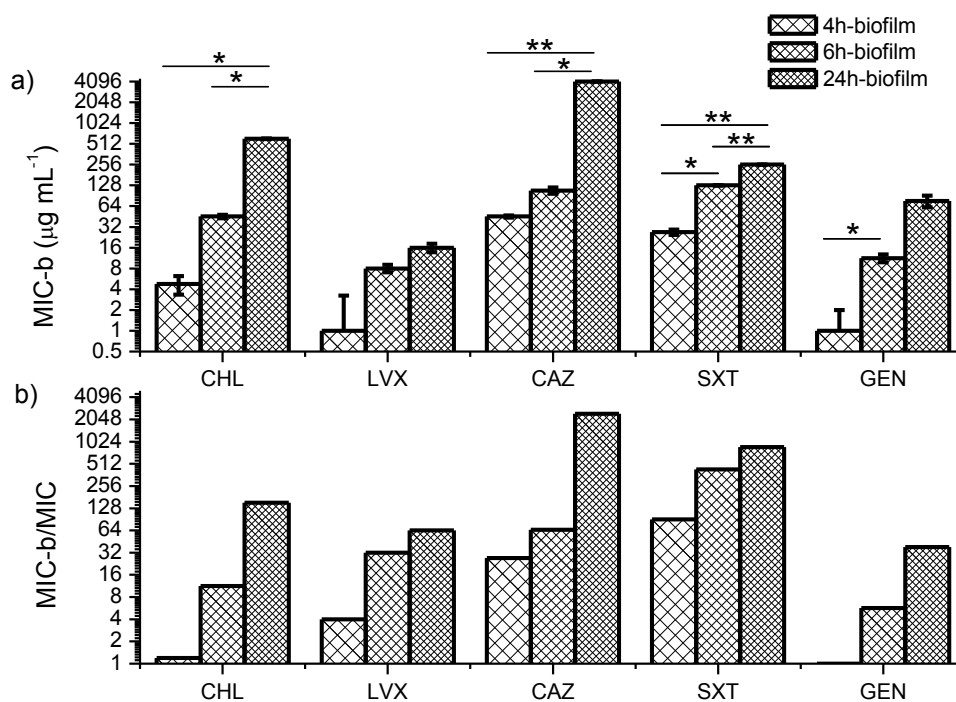


Gráfico 3: Susceptibilidade aos antimicrobianos do biofilme de *S. maltophilia* em biofilme (MIC-b) em diferentes tempos de maturação do biofilme (4, 6 e 24h).

(a) MIC-b representado como média geométrica e desvio padrão de três experimentos independentes realizados com quatro amostras selecionadas aleatoriamente. MIC-b foi definido como a menor concentração do antimicrobiano que reduz em 10 vezes ($1 \log_{10}$ ou 90%) a DO_{492} do controle de crescimento. (b) Representação da razão MIC-b/MIC. CHL: cloranfenicol; LVX: Levofloxacina; CAZ: Ceftazidima; SXT: trimetoprim-sufametoxazol; GEN: Gentamicina. Teste T de amostra pareada com $P < 0,05$. * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$

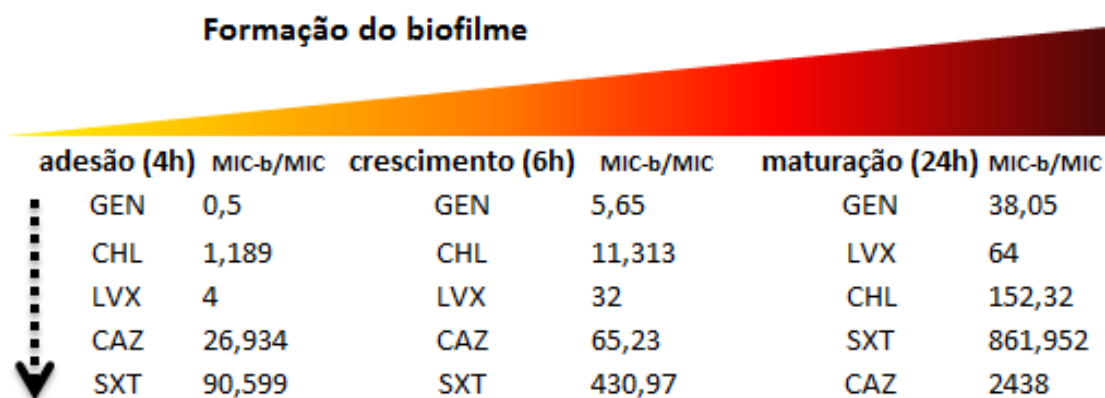


Figura 7: Esquema de organização dos antimicrobianos em ordem decrescente (seta) de atividade contra *S. maltophilia* em diferentes estágios de formação de biofilme.

GEN: Gentamicina, CHL: Cloranfenicol; LVX: Levofloxacina; CAZ: Ceftazidima; SXT: Trimetoprim-sufametoxazol;

5. DISCUSSÃO

Muitas técnicas de tipagem molecular baseadas na reação em cadeia pela polimerase (PCR) são alternativas à eletroforese de campo pulsado (PFGE), que, apesar de seu elevado poder discriminatório, requer equipamento especializado, pessoal técnico treinado e muito tempo de trabalho. Uma destas sequências mais selecionadas como alvo para desenho de iniciadores incluem a *enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC) que foi utilizada em nosso trabalho. ERIC-PCR é um método rápido, fácil e de baixo custo cuja utilidade já foi demonstrada em diversos trabalhos de vigilância epidemiológica de *S. maltophilia* (LIN et al., 2008; CAYLAN et al., 2004; MOTAMEDIFAR et al., 2017). De modo geral, houve heterogeneidade entre as amostras com mais 50% das linhagens apresentando diferentes *fingerprints* nas duas clínicas majoritárias (86 e 87). Índices de diversidade genética de isolados clínicos de *S. maltophilia* semelhantes aos encontrados em nosso estudo (78%) foram relatados em amostras clínicas na Argentina (ALCARAZ et al., 2018), Índia (KAUR et al., 2015), Hungria (JUHÁSZ et al., 2014) e Turquia (CAYLAN et al., 2004) pela mesma técnica ERIC-PCR. Por outro lado, alta similaridade entre isolados clínicos de *S. maltophilia* foram relatados no Iran (MOTAMEDIFAR et al., 2017) e no Brasil (GALLO et al., 2016).

A Organização Mundial da Saúde classifica *S. maltophilia* como um dos principais microrganismos resistentes a múltiplos fármacos em ambientes hospitalares (WHO, n.d.). A partir do final dos anos 90, os programas mundiais de vigilância e estudos multicêntricos começaram a fornecer informações mais abrangentes sobre a patogenicidade e a susceptibilidade de *S. maltophilia* aos antimicrobianos, sendo os mais conhecidos o Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY, iniciado em 1997, e o Estudo de Monitoramento de Tendências de Resistência a Antimicrobianos (SMART), iniciado em 2002 (CHANG et al., 2015).

Como parte do SENTRY, um total de 842 isolados de *S. maltophilia* foram coletados entre janeiro de 1997 e dezembro de 1999 em 5 regiões geográficas (Canadá, Estados Unidos, América Latina, Europa e Ásia-Pacífico). Neste estudo as taxas de resistência ao SXT variaram de 2% no Canadá e na América Latina a 10% na Europa (GALES et al., 2001). Em 2014, na França, 45 cepas de *S. maltophilia* isoladas de amostras de sangue de pacientes em uma unidade de

hematologia mostraram taxas de resistência a SXT de 4% (BOUSQUET et al., 2014). Em 2015, Chang e colaboradores forneceram uma síntese de informações relatadas por projetos de vigilância mundial e nacional, bem como estudos multicêntricos sobre as tendências globais de susceptibilidade aos antimicrobianos em *S. maltophilia*, bem como sua frequência de ocorrência em infecções hospitalares. A prevalência da infecção por *S. maltophilia* na população geral aumentou de 0,8 a 1,4% durante 1997-2003 para 1,3 a 1,68% durante 2007-2012, mas SXT continua sendo a droga antimicrobiana de escolha contra *S. maltophilia*. Díez-Aguilar, em 2018, testou 106 amostras de *S. maltophilia* isoladas de pacientes com fibrose cística nos Países Baixos, Irlanda do Norte, Espanha, EUA e Austrália e mostrou que SXT foi, também, o composto mais ativo contra todos os isolados ($MIC_{50} = 0,12-4 \mu\text{g/mL}$, $MIC_{90} = 1-16 \mu\text{g/mL}$) com 47% das amostras susceptíveis.

Por outro lado, um estudo realizado na China com 40 pacientes que apresentavam infecção do trato respiratório e infecção de corrente sanguínea causada por *S. maltophilia* mostrou elevada taxa de resistência a SXT (79,4%) (XUN et al., 2014). Outro estudo epidemiológico chinês, publicado em 2018, mostrou tendência de aumento da resistência aos antimicrobianos e frequências cada vez maiores de isolados de *S. maltophilia* multirresistentes durante um período de 10 anos, em que a porcentagem de isolados resistentes a SXT foi alterada de 29,7% em 2005-2009 para 47,1% em 2010-2014. No geral a taxa de resistência a SXT foi 38,7% com $MIC_{50} = 0,5/9,5 \mu\text{g/mL}$ e $MIC_{90} = 32/608 \mu\text{g/mL}$ (HU et al., 2017).

No México também foi publicado, em 2017 um estudo mostrando que 25% das 126 amostras clínicas testadas em um hospital do México eram resistentes ao SXT e também mostrou que de 2012 para 2013 a prevalência de amostras resistentes ao SXT aumentou de 26,9% para 30,8%, no México (HERRERA-HEREDIA et al., 2017).

No Brasil, em 2004, SXT foi o agente antimicrobiano mais potente testado contra 70 isolados clínicos de *S. maltophilia* em um hospital de São Paulo (100% de amostras susceptíveis) com $MIC_{50} = 0,06 \mu\text{g/mL}$ e $MIC_{90} = 0,12 \mu\text{g/mL}$ (NICODEMO et al., 2004). Estes resultados corroboram com os nossos que mostraram sensibilidade de todas as amostras ao SXT com MIC_{50} e $MIC_{90} = 0,25/4,75 \mu\text{g/mL}$. Ainda no Brasil, em Porto Alegre, em 2016, Gallo e

colaboradores caracterizaram o perfil de resistência aos antimicrobianos de linhagens de *S. maltophilia* coletadas de 936 amostras do ambiente hospitalar e dispositivos médicos, além de 100 isolados de espécimes clínicos. *S. maltophilia* foi encontrada em 3% das amostras coletadas, especialmente nos trilhos da cama dos quartos do hospital. A resistência ao SXT foi encontrada em 14,8% dos isolados (GALLO et al., 2016).

Embora alguns estudos tenham relatado aumento da resistência ao SXT, a maioria dos levantamentos em todo o mundo mostra que *S. maltophilia* continua altamente suscetível, de forma que SXT continua sendo a droga de escolha para o tratamento de infecções por este microrganismo. Além disso, SXT pode, ainda, ser combinado ao levofloxacino (XUN et al., 2014; WANG et al., 2016), cloranfenicol (GALLO et al., 2016) e gentamicina.

No que diz respeito à atividade de levofloxacina, nossos dados mostraram 100% de sensibilidade das amostras de *S. maltophilia*. Ao contrário, em um estudo SMART realizado na região da Ásia-Pacífico, isolados de *S. maltophilia* de pacientes com ITU mostraram taxas excepcionalmente altas de resistência à levofloxacina (33,3%) (LU et al., 2012). Estudos SENTRY revelam uma diminuição na sensibilidade de *S. maltophilia* à levofloxacina, de 83,4% durante o período 2003-2008 (FARRELL et al., 2010a) para 77,3% em 2011 (SADER et al., 2013). Baixas taxas de suscetibilidade variando de 64-80% também foram relatadas no Canadá (ZHANEL et al., 2013), China (YANG et al., 2010; TAN et al., 2014, HU et al., 2014) e Coréia (CHUNG et al., 2013). Na China, em 2018 a taxa de susceptibilidade a levofloxacina foi de 80% com MIC₅₀ = 0,5 µg/mL e MIC₉₀ = 32 µg/mL (HU et al., 2014). No Brasil a maioria dos isolados é suscetível à levofloxacina (>90%) (GALLO et al., 2016), corroborando nossos achados.

Em nosso estudo cloranfenicol mostrou cobertura contra 95% dos isolados de *S. maltophilia*., corroborando com estudos brasileiros no qual 80,3% dos isolados foram susceptíveis ao cloranfenicol MIC₅₀ = 4 µg/mL e MIC₉₀ = 16 µg/mL (NICODEMO et al., 2004). A importância do cloranfenicol no controle de *S. maltophilia* foi demonstrada em um paciente com mielofibrose com dispositivo de bexiga colonizado, na Itália, cujo perfil de susceptibilidade mostrou sensibilidade apenas ao cloranfenicol e rifampicina (SAVINI et al., 2010). Entretanto, na China a porcentagem de isolados resistentes ao cloranfenicol é de 30,3% com MIC₅₀ = 16 µg/mL e MIC₉₀ = 128 µg/mL (HU et al., 2017).

Fármacos com resultados de susceptibilidade historicamente bons contra *S. maltophilia* incluíam ceftazidima além das fluoroquinolonas. No entanto, vários estudos mostram uma tendência alarmante na resistência a esses agentes (CHANG et al., 2015). Em nosso estudo, ceftazidima foi o antimicrobiano menos efetivo contra *S. maltophilia* com apenas 30% de amostras sensíveis. Dados publicados pelo Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY, em 2001, mostram que a resistência a ceftazidima variou de 25% nos isolados da América Latina a 53% na Ásia-Pacífico (GALES et al., 2001). Vários estudos tem demonstrado taxas de resistência de mais de 30% e tendência de diminuição da susceptibilidade a ceftazidima (47–75% de 1997–1999 para 30.5–36.8% de 2009–2012) (GALES et al., 2001a; FARRELL et al., 2010a; SADER et al., 2014b). Em isolados clínicos franceses (n=45), a taxa de resistência a ceftazidima foi de 49% (BOUSQUET et al., 2014), de 52,3% em amostras mexicanas (HERRERA-HEREDIA et al., 2017) e de 41% em amostras chinesas, com MIC₅₀=4µg/mL e MIC₉₀=2560µg/mL (HU et al., 2017). Ceftazidima também apresentou os menores níveis de susceptibilidade (35%, MIC₅₀=32µg/mL, MIC₉₀=256µg/mL) em amostras isoladas de pacientes com fibrose cística nos Países Baixos, Irlanda do Norte, Espanha, EUA e Austrália (DÍEZ-AGUILAR et al., 2018). No Brasil, alta resistência à ceftazidima foi detectada em isolados clínicos (79%) e do ambiente hospitalar (46,4%) (GALLO et al., 2016). Essa resistência é possivelmente devido a produção de β-lactamases por *S. maltophilia*, considerada o principal mecanismo responsável pela resistência intrínseca aos β-lactâmicos (SANCHEZ et al., 2009).

A resistência à gentamicina (20% dos isolados) também foi mostrada em nosso trabalho e é importante destacar a alta taxa de resistência a aminoglicosídeos pois essas drogas são usadas como terapias empíricas na maioria das infecções nosocomiais (NICOLETTI, 2009; HERRERA-HEREDIA et al., 2017).

S. maltophilia é conhecida como resistente a vários grupos de antimicrobianos, incluindo β-lactâmicos e aminoglicosídeos (NICODEMO et al., 2007). Embora Nicodemo (2007) e Herrera-Heredia et al (2017) mostrem que o uso de aminoglicosídeo contra *S. maltophilia* não tem um resultado positivo devido a baixa suscetibilidade desse microorganismo e o CLSI (2018) não preconiza a gentamicina contra *S. maltophilia*, em nosso trabalho encontramos 65% das amostras sensíveis a gentamicina.

A seleção de antimicrobianos para o tratamento de infecções por *S. maltophilia* é baseada em resultados de testes de suscetibilidade de microorganismos na forma planctônica. No entanto, sabe-se que a *S. maltophilia* cresce em comunidades, como biofilmes, que exibem maior resistência a antimicrobianos quando comparados com bactérias planctônicas (DONLAN, 2002; BJARNSHOLT et al., 2009). Isso sugere que a seleção de antimicrobianos para infecções por *S. maltophilia* com base na suscetibilidade das bactérias em biofilme pode fornecer um guia mais confiável para uma terapia antimicrobiana.

Neste estudo, utilizando um ensaio de microplaca, foi mostrada a capacidade de adesão à superfície abiótica de todas as amostras clínicas de *S. maltophilia* estudadas corroborando dados da literatura (DI BONAVENTURA et al., 2007 e POMPILIO et al., 2010). Mostramos, também, as diferentes fases de formação do biofilme de *S. maltophilia* (adesão, crescimento exponencial e maturação), cuja intensidade foi moderada e cuja cinética foi mais acelerada do que aquela relatada por Wang et al (2016).

Em nosso estudo mostramos a susceptibilidade do biofilme de *S. maltophilia* aos antimicrobianos gentamicina, levofloxacina, e cloranfenicol e como essa ação é dependente do estágio de formação do biofilme, pois quanto menos estruturado for o biofilme, maior foi a susceptibilidade ao antimicrobiano.

Todos os isolados testados por nós na forma planctônica se mostraram sensíveis a SXT, confirmando sua indicação como droga de primeira escolha contra *S. maltophilia*. Entretanto contra as amostras em biofilme, SXT mostrou o pior resultados nas fases iniciais de formação do biofilme e o segundo pior em biofilmes maduros. Wu et al (2013) também mostrou limitada atividade de SXT, tanto na forma planctônica, com apenas metade dos isolados susceptíveis, quanto em biofilme, com menos que 10% das amostras susceptíveis. Por outro lado, Biocanin et al (2017) mostrou que o biofilme formado por *S. maltophilia* pode ser erradicado com 50µg/mL de SXT em 6 horas exposição, simulando as concentrações alcançadas no muco das vias áreas superiores de pacientes com fibrose cística. Ambos os trabalhos foram realizados com concentrações fixas do antimicrobiano e nenhum deles relatou MIC-b de SXT, o que dificulta as comparações com nossos resultados.

Encontramos bons resultados para levofloxacina que foi o segundo antimicrobiano mais eficiente contra biofilme de 6 e 24 horas, corroborando os

achados de Rossi, 2009. Wang et al (2016) mostrou em seu trabalho que a levofloxacina e mais duas outras fluoroquinolonas (moxifloxacina e ciprofloxacina), de fato possuem boa atividade contra o biofilme imaturo (4 ou 10 horas) formado por *S. maltophilia*. Estas fluoroquinolonas reduzem significativamente a biomassa de biofilmes e seu uso em concentrações terapêuticas alcançadas no escarro de pacientes com fibrose cística pode inibir a formação de biofilmes (WANG et al., 2016). O estudo de Wu et al (2013) feito com 125 isolados clínicos de *S. maltophilia* no Canadá mostrou que levofloxacina foi o antimicrobiano mais eficaz com mais de 50% dos isolados suscetíveis.

Pompilio et al (2010) já havia relatado que concentrações subinibitórias de moxifloxacina reduziram significativamente a adesão e formação de biofilme em *S. maltophilia* oriunda de paciente com fibrose cística, confirmando a utilidade das fluoroquinolonas neste grupo de pacientes e, de modo geral, em infecções relacionadas a biofilmes de *S. maltophilia* (POMPILIO et al., 2010). SubMICs de antimicrobianos podem inibir a adesão bacteriana através de diferentes mecanismos. Eles podem inibir a síntese ou expressão de adesinas na superfície celular bacteriana, levar à formação de adesinas funcionalmente danificadas, ou modificar a forma bacteriana de forma a interferir com a capacidade dos microrganismos de se ligarem aos receptores de superfície celular do hospedeiro (LORIAN; ERNST, 1987; LORIAN et al., 1989). Entretanto, em estudo mais recente, feito com cinco isolados de escarro de pacientes com fibrose cística Pompilio e colaboradores (2016) mostraram que levofloxacina não foi capaz de erradicar o biofilme de 24 horas formado por *S. maltophilia*, mesmo após 24 horas de exposição a esse antimicrobiano concluindo que o biofilme de *S. maltophilia* é intrinsecamente resistente a concentrações terapêuticas de levofloxacina em condições similares às aquelas encontradas na fibrose cística.

Em nosso estudo gentamicina apresentou o melhor resultado de inibição de biofilmes de *S. maltophilia* em todos os estágios de sua formação. Ressaltamos que os aminoglicosídeos não são indicados para testes com estes microrganismos, devido à resistência intrínseca de muitos isolados, embora 65% das amostras de nosso estudo tenham apresentado sensibilidade na forma planctônica. Wu et al (2013) também mostrou que o aminoglicosídeo tobramicina foi efetivo contra 60% dos isolados na forma planctônica, mas apenas 20% foram suscetíveis a altas doses de tobramicina em biofilme. Um estudo chinês mais

recente mostrou que gentamicina não foi capaz de inibir o biofilme formado por nenhum dos 42 isolados de *S. maltophilia* (SUN, 2016), indicando que a susceptibilidade de *S. maltophilia* aos aminoglicosídeos exibe padrão regional.

Ceftazidima, por sua vez, apresentou a maior taxa de resistência nas células planctônicas e ineficiência sobre todas as fases do biofilme, o que está de acordo com os estudos de Bonaventura et al (2004) que analisou 50 isolados clínicos na Itália mostrando que ceftazidima não reduziu em nada a biomassa do biofilme de *S. maltophilia*. Wu et al (2013) também mostrou que menos de 10% dos isolados de *S. maltophilia* foram susceptíveis à ceftazidima em biofilme e pouco mais de 20% na forma planctônica, indicando a limitação deste beta-lactâmico contra *S. maltophilia*.

Em nosso estudo, o efeito inibitório dos antimicrobianos testados foi significativamente reduzido para biofilmes quando os antimicrobianos foram aplicados em biofilmes formados de 24 horas de incubação. Esses achados podem ser explicados por alguns fatores, como a diferença na permeabilidade ao antimicrobiano do biofilme nos estágios iniciais e maduros do desenvolvimento, pois a matriz polissacarídica se comporta como barreira, quando a matriz ainda não está bem estruturada no biofilme novo, ela é mais permeável ao antimicrobiano. A heterogeneidade associada ao crescimento celular também pode explicar a redução da atividade do antimicrobiano sobre o biofilme, pois antimicrobianos que inibem a síntese proteica dependem da atividade celular. Outro fator responsável pela maior resistência das células em biofilmes, quanto aos antimicrobianos é o sistema de “quorum sensing”, por esse sistema as células se comunicam afim de regular a densidade populacional fazendo com que apresentem crescimento lento, interferindo na ação de antimicrobianos (MAH; O'TOOLE, 2001).

Assim, com base em nossos estudos, concluímos que quanto mais cedo iniciar o tratamento de infecção por *S. maltophilia*, melhor pode ser o resultado, devido a maior susceptibilidade do biofilme quando no estágio inicial de sua formação. Além disso, concluímos que gentamicina pode ser uma boa opção contra infecções relacionadas a biofilmes de *S. maltophilia* em regiões onde este microrganismo apresente susceptibilidade aos aminoglicosídeos. Levofloxacina continua sendo uma boa opção contra biofilmes de *S. maltophilia*, juntamente com cloranfenicol. Por outro lado, SXT que atualmente é considerado o padrão ouro

para infecção por *S. maltophilia* não deve ser usado em infecções onde biofilmes possam estar presentes.

6. CONCLUSÕES

- A tipagem molecular de *S. maltophilia* mostra heterogeneidade entre as amostras.
- Todas as amostras clínicas em suas formas planctônicas são sensíveis a levofloxacina e ao sulfametoxazol-trimetoprim e a maioria é sensível ao cloranfenicol. Maiores frequências de resistência foram para gentamicina e ceftazidima.
- As amostras são todas produtoras moderadas de biofilme.
- A susceptibilidade aos antimicrobianos diminui com o aumento do tempo de formação do biofilme.
- Gentamicina foi o antimicrobiano com melhor atividade em biofilme, independente do tempo de formação seguido por levofloxacina que em biofilme maduro foi o segundo mais eficaz.
- O antimicrobiano menos eficaz em todos os tempos de formação do biofilme foi sulfametoxazol-trimetoprim e o menos efetivo contra biofilmes de 24h foi ceftazidima.

7. REFERÊNCIAS

- ALCARAZ, E. et al. ***Stenotrophomonas maltophilia* isolated from patients exposed to invasive devices in a university hospital in Argentina: molecular typing, susceptibility and detection of potential virulence factors.** J Med Microbiol. v. 67. 2018.
- ANZAI, Y; et al. **Phylogenetic affiliation of the pseudomonas based on 16S rRNA sequence.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. v.50, 2017.
- ARVANITIDOU, M. et al. **Occurrence and antimicrobial resistance of Gramnegative bacteria isolated in haemodialysis water and dialysate of renal units: results of a Greek multicentre study.** Journal of Applied Microbiology. p. 180-185, 2003.
- BAEK, J. E. et al. ***Stenotrophomonas maltophilia* infection in patients receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis.** Korean J Intern Med v.19. 2004.
- BALLESTERO, S. et al. ***Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis patients.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis. v.14. 1995.
- BETJES, M. G. H; AGTEREN, M. V. **Prevention of dialysis catheter-related sepsis with a citrate-taurolidine-containing lock solution.** Nephrol Dial Transplant. v. 19. 2004.
- BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. **Coagulase-negative staphylococci.** Clinical Microbiology Reviews. v.27, n.4, 2014.
- BIOCANIN, M. et al. **Temperature, pH and Trimethoprim-Sulfamethoxazole Are Potent Inhibitors of Biofilm Formation by *Stenotrophomonas maltophilia* Clinical Isolates.** Polish Journal of Microbiology. v.66, n.4. 2017.
- BJARNSHOLT, T.; et al. ***Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients.** Pediatric Pulmonology. v.44, n.6, 2009.
- BLAHOVÁ, J.; et al. **Transferable antibiotic resistance in nosocomial *Stenotrophomonas maltophilia* strain.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. v.29, n.3, 1997.
- BLOCK, C. et al. **Outbreak of bloodstream infections associated with dialysis machine waste ports in a hemodialysis facility.** European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. v.18. 1999.
- BONAVENTURA, G. Di et al. **Biofilm Formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: Modulation by Quinolones, Trimethoprim-Sulfamethoxazole, and Ceftazidime.** Antimicrobial agents and chemotherapy. v.48, n.1, 2004.

BONAVENTURA, G. Di. et al. **Molecular characterization of virulence determinants of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from patients affected by cystic fibrosis.** Int J Immunopathol Pharmacol. v.20, n.3, 2007.

BOUSQUET, A. et al. **An 8-year survey of strains identified in blood cultures in a clinical haematology unit.** Clin Microbiol Infect. v.20. n.1. 2014.

CAYLAN, R. et al. **An epidemiological analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* strains in a university hospital.** Japanese journal of infectious diseases. v.40. 2004.

CHANG, Y. T. et al. **Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options.** Front Microbiol. v.6. 2015.

CHUNG, H. S. et al. **Antimicrobial susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from Korea, and the activity of antimicrobial combinations against the isolates.** J. Korean Med. Sci. v.28, 2013.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.** 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI. Z. **Microbial Biofilms.** Annu Rev Microbiol. v.49, 1995.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. **Bacterial Biofilms: A Common Cause of persistent infections.** Science. v.284, 1999.

DENTON, M.; KERR, K. G. **Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas maltophilia*.** Clinical microbiology reviews v.11, n.1, 1998.

DENTON, M. et al. ***Stenotrophomonas maltophilia* contamination of nebulizers used to deliver aerosolized therapy to inpatients with cystic fibrosis.** Journal of Hospital Infection. v.55, n.3, 2003.

DÍEZ-AGUILAR, M. et al. **Antimicrobial susceptibility of non-fermenting Gram-negative pathogens isolated from cystic fibrosis patients.** Int J Antimicrob Agents. 2018.

DONLAN, R. M. **Biofilms: Microbial life on surfaces.** Emerging Infectious DISEASES. V.8, N.9, 2002.

FARRELL, D. J.; SADER, H. S.; JONES, R. N. **Antimicrobial susceptibilities of a worldwide collection of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates tested**

against tigecycline and agents commonly used for *S. maltophilia* infections. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v.54, 2010.

FIHMAN, V. et al. ***Stenotrophomonas maltophilia*** - The most worrisome threat among unusual non-fermentative gram-negative bacilli from hospitalized patients: A prospective multicenter study. Journal of Infection. v.64, n.4, 2012.

GALES, A. C. aEt al. **Emerging Importance of Multidrug-Resistant *Acinetobacter* Species and *Stenotrophomonas maltophilia* as Pathogens in Seriously Ill Patients: Geographic Patterns, Epidemiological Features, and Trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–1999).** Clin Infect Dis. v.32. 2001.

GALLO, S. W. et al. **Isolation and Characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates from a Brazilian Hospital.** Microbial Drug Resistance. v. 22. n. 8. 2016

GILLIGAN, P. H.; WHITTIER, S. **Burkholderia, *Stenotrophomonas*, Ralstonia, Brevundimonas, Comamonas, and Acidovorax**, p. 526–538. In MURRAY, et al. Manual of clinical microbiology, 7.ed. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C. 1999.

HAN, Z.; LIANG, S.; MARSCHAL, J. **Current strategies for the prevention and management of central line-associated bloodstream infections.** Infection and Drug Resistance.v.3, 2010

HANBERGER, H. et al. **Antibiotic Susceptibility Among Aerobic Gram-negative Bacilli in Intensive Care Units in 5 European Countries.** JAMA. v.281. n.1, 1999.

HERAS, J. et al. **GeIJ -a tool for analyzing DNA fingerprint gel images.** BMC Bioinformatics. v.16. p. 270. 2015.

HERRERA-HEREDIA et al. **Risk factors and molecular mechanisms associated with trimethoprim–sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* in Mexico.** Journal of Medical Microbiology. v.66. 2017.

HU, L. F. et al. **Susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains in China to antimicrobial combinations.** J. Chemother. v.26. 2014.

HU, L. F. et al. **Increase in the Prevalence of Resistance Determinants to Trimethoprim/Sulfamethoxazole in Clinical *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates in China.** PLoS ONE. v.11. n.6. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157693>>. Acesso em 15 de out, 2016.

HU, L. F. et al. **Surveillance of antimicrobial susceptibility patterns among *Stenotrophomonas maltophilia* isolated in China during the 10-year period of**

2005–2014. J Chemother. v.30. 2017.

HUGH, R.; LEIFSON, E. **A description of the type strain of *Pseudomonas maltophilia***. International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy. v.13, n.3, 1963.

JOCHIMSEN, E. et al. **A cluster of bloodstream infections and pyrogenic reactions among hemodialysis patients traced to dialysis machine waste-handling option units**. American Journal of Nephrology. v. 18. 1998.

JUHÁSZ, E. et al. **Infection and colonization by *Stenotrophomonas maltophilia*: antimicrobial susceptibility and clinical background of strains isolated at a tertiary care centre in Hungary**. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2014.

KATARIA, A. et al. **Hemodialysis cateter-related bacteremia caused by *Stenotrophomonas maltophilia***. India J Nephrol. v.25. n.5. 2015.

KAUR, P.; GAUTAM, V.; TEWARI, R. **Distribution of Class 1 Integrins, *sul1* and *sul2* Genes Among Clinical Isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* from a Tertiary Care Hospital in North India**. Microb Drug Resist v. 5. 2015.

KERR J. R. **Inhibition of growth of fungi pathogenic to man by *Stenotrophomonas maltophilia***. J Med Microbiol. v.45, n.5, 1996.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Ed. Médica e Científica. p. 351-371. 2008.

LAI, C. H. et al. **Clinical characteristics and prognostic factors of patients with *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia**. Journal of Microbiology Immunology and Infection. v.37, n.6, 2004.

LEE, Y. K. et al. **Successful antibiotic lock therapy in patients with refractory peritonitis**. Clin Nephrol. v.72. 2009.

LI, X. et al. **Systemic diseases caused by oral infection**. Clin Microbiol Ver. v.13, n.4, 2000.

LIN, C. W. et al. **Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and three rep-PCR methods for evaluating the genetic relatedness of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates**. Lett Appl Microbiol. v.47. 2008.

LOONEY, W. J.; NARITA, M.; MÜHLEMANN, K. ***Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen**. The Lancet Infectious Diseases. v.9, n.5, 2009.

LORIAN, V.; ERNST, J. **Effects of antibiotic on bacterial structure and their pathogenicity**. Pathol Biol. V.35, 1987.

LORIAN, V.; ERNST, J.; AMARAL, L. **The post-antibiotic effect defined by bacterial morphology**. J Antimicrob Chemother. v.23, 1989.

LU, P. L. et al. **Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of Gram-negative bacteria causing urinary tract infections in the Asia-Pacific region: 2009-2010 results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART).** Int. J. Antimicrob. Agents. v.40. 2012.

MAH, T. C.; O'TOOLE, G. A. **Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents.** Trends Microbiol. v.9, 2001.

MARSHALL, W. F. et al. ***Xanthomonas maltophilia*: An Emerging Nosocomial Pathogen.** Mayo Clinic Proceedings. v.64, 1989.

MOTAMEDIFAR, M. et al. **Molecular epidemiology and characteristics of 16 cases with *Stenotrophomonas maltophilia* bacteraemia in pediatric Intensive Care Units.** Annali di igiene: medicina preventiva e di comunita. v. 29. n.4. 2017.

NICODEMO, A. C. et al. **In vitro susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates: comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution methods.** J Antimicrob Chemother. v.53. 2004.

NICODEMO, A. C.; PAEZ, J. I. **Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis. v.26. 2007.

NICOLETTI, M. A. ***Stenotrophomonas maltophilia* strains from cystic fibrosis patients: genomic variability and molecular characterization of some virulence determinants.** Int. J. Med. Microbiol. v.301. 2011.

NUNVAR et al. **DNA profiling of *Stenotrophomonas maltophilia* by PCR targeted to its species-specific repetitive palindromic sequences.** Letters in Applied Microbiology. v.54. 2011

OLIVEIRA-GARCIA, D. et al. **Characterization of flagella produced by clinical strains of *Stenotrophomonas maltophilia*.** Emerging Infectious Diseases. v.8, n.9, 2002.

OLIVEIRA-GARCIA, D. et al. **Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces.** Cellular Microbiology, v.5, n.9, 2003.

PALLERONI, N. J.; BRADBURY, J. ***Stenotrophomonas*, a New Bacterial Genus for *Xanthomonas*.** v.43, n.3, 1993.

POMPILIO, A.; et al. **Subinhibitory concentrations of moxifloxacin decrease adhesion and biofilm formation of *Stenotrophomonas maltophilia* from cystic fibrosis** Journal of Medical Microbiology. v.59, 2010.

POMPILIO, A. et al. **In vitro activity of levofloxacin against planktonic and biofilm *Stenotrophomonas maltophilia* lifestyles under conditions relevant to pulmonary infection in cystic fibrosis, and relationship with SmeDEF**

multidrug efflux pump expression. FEMS Microbiol Lett. v.363. n.14. 2016.

POP-VICAS, A; D'ÁGATA, E. **The Rising Influx of Multidrug-Resistant GramNegative Bacilli into a Tertiary Care Hospital.** Clinical Infectious Diseases.v.40, n.12, 2005.

ROBIN, T.; JANDA, J. M. **Pseudo-, Xantho-, Stenotrophomonas:** an emerging pathogen in search of genus. Clin Microbiol News. v.18, n.2, 1996.

ROSSI, B. et al. **Activity of levofloxacin and ciprofloxacin on biofilms and planktonic cells of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with device-associated infections.** International journal of antimicrobial agentes. v.34, 2009.

SADER, H. S.; FLAMM, R. K.; JONES, R. N. **Tigecycline activity tested against antimicrobial resistant surveillance subsets of clinical bacteria collected worldwide.** Diagn. Microbiol. Infect. Dis. v.76, 2011.

SADER, H. S., et al. **Variation in potency and spectrum of tigecycline activity against bacterial strains from U.S. medical centers since its approval for clinical use (2006 to 2012).** Antimicrob. Agents Chemother. v.58, 2014.

SAFDAR, A.; ROLSTON, K. V. ***Stenotrophomonas maltophilia*:** fing spectrum of a serious bacterial pathogen in patients with cancer. Clinical Infectious Diseases. v.45, 2007.

SÁNCHEZ, P.; ALONSO, A.; MARTINEZ, J. L. **Cloning and Characterization of SmeT , a Repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* Multidrug Efflux Pump SmeDEF.** v.46, n.11, 2002.

SANCHEZ, M. B.; HERNANDEZ, A. E MARTINEZ, J. ***Stenotrophomonas maltophilia* drug resistance.** Future Microbiol. v. 4. n.6. 2009.

SAVINI, V. et al. **Chloramphenicol and rifampin may be the only options against *Stenotrophomonas maltophilia*. A tale of a colonized bladder device in a patient with myelofibrosis.** Infez Med. v.18. n. 3. 2010.

SENL, E. ***Stenotrophomonas maltophilia*:** The significance and role as a nosocomial pathogen. Journal of Hospital Infection. v.57, n.1, 2004.

SINGH, P. K. et al. **Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms.** Nature. v.407, n.6805, 2000.

STEINKAMP, G. et al. **Prospective evaluation of emerging bacteria in cystic fibrosis.** J Cyst Fibros. v. 4. 2005.

STEPANOVIC, S. et al. **Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci.** APMIS.v.115, n.8, 2007.

STEWART, P. S. **Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms.** Antimicrob. Agents Chemother. v.40, n.11, 1996.

SUMAN, E. et al. **The Riginal articlthe bacterial biofilms in dialysis water systems and the effect of the sub inhibitory concentrations of chlorine on them.** Journal of Clinical and Diagnostic Research. v.7, n.5. 2013.

SUN, E. **Antimicrobial susceptibility of hospital acquired *Stenotrophomonas maltophilia* isolate biofilms.** Braz J Infect Dis. v.20. 2016.

TAN, R. et al. **Epidemiology and antimicrobial resistance among commonly encountered bacteria associated with infections and colonization in intensive care units in a universit affiliated hospital in Shanghai.** J. Microbiol. Immunol. Infect. v.47, 2014.

TREVINO, S. F. et al. ***Stenotrophomonas maltophilia* in Mexico: antimicrobial resistance, biofilm formation and clonal diversity.** J Med Microbiol v.63. 2014.

TZANETOU, K. et al. ***Stenotrophomonas maltophilia* peritonitis in CAPD patients: susceptibility to antibiotics and treatment outcome: a report of five cases.** Peritoneal Dialysis International. v.24. 2004.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKY, J. R. **Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes.** Nucleic Acids Res.v.19. 1991.

VINCENTI, S. et al. **Non-fermentative gram-negative bacteria in hospital tap water and water used for haemodialysis and bronchoscope flushing: Prevalence and distribution of antibiotic resistant strains.** Sci Total Environ. v.499. 2014.

XUN, M. et al. **Clinical characteristics and risk factors of infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in a hospital in northwest China.** J. Infect. Dev. Ctries. v.8. 2014.

WAKINO, S. et al. **Clinical importance of *Stenotrophomonas maltophilia* nosocomial pneumonia due to its high mortality in hemodialysis patients.** Ther Apher Dial v.13. 2009.

WANG, S. A. et al. **An outbreak of gram-negative bacteremia in hemodialysis patients traced to hemodialysis machine waste drain ports.** Infection Control and Hospital Epidemiology. v.20. 1999.

WANG, A. et al. **Effects of Fluoroquinolones and Azithromycin on Biofilm Formation of *Stenotrophomonas maltophilia*.** Scientific Reports. v.6, n.29701, 2016.

WHITBY, P. W. et al. **Identification and Detection of *Stenotrophomonas maltophilia* by rRNA-Directed PCR**. Journal of clinical microbiolog. v.38, n.12, 2000.

WHO. Public health importance of antimicrobial resistance. n.d. Disponível em: <www.who.int/drugresistance/%0AAMR_Importance/en/>. Acesso em 01 de nov, 2018.

WU, K. et al. **Biofilm compared to conventional antimicrobial susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients**. Antimicrobial agents and chemotherapy. v.57. 2013.

YANG, Q. et al. **Surveillance of antimicrobial susceptibility of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections in China: the 2002-2009. Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART)**. Int. J. Antimicrob. Agents. v. 36, 2010.

ZHANEL, G. G. et al. **Antimicrobial susceptibility of 22746 pathogens from Canadian hospitals: results of the CANWARD 2007-11 study**. J. Antimicrob. Chemother. v.68, s.1, 2013.

ZHANG, L.; LI, X. Z.; POOLE, K. **Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: involvement of a multidrug efflux system**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v.44, n.2 ,2000.

ZHUO, C.; ZHAO, Q. Y.; XIAO, S. N. **The impact of *spgM*, *rpfF*, *rmlA* gene distribution on biofilm formation in *Stenotrophomonas maltophilia***. PloS one. v.9. 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108409>>. Acesso em 15 de out, 2018.